



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
Programa de Pós-Graduação em Química  
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA



FERNANDA GALVÃO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
BASEADA NO PROCESSO DE FOTO-OXIDAÇÃO UV  
PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn E Zn EM SUCOS DE  
FRUTA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO  
ATÔMICA EM CHAMA (FAAS)**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner

GUARAPUAVA

2017

FERNANDA GALVÃO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
BASEADA NO PROCESSO DE FOTO-OXIDAÇÃO UV  
PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn E Zn EM SUCOS DE  
FRUTA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO  
ATÔMICA EM CHAMA (FAAS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual do Centro-Oeste como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner

GUARAPUAVA

2017

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

G182d Galvão, Fernanda  
Desenvolvimento de metodologia analítica baseada no processo de foto-oxidação UV para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) / Fernanda Galvão. -- Guarapuava, 2017  
xi, 73 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, Mestrado em Química Aplicada, 2017

Orientadora: Maria Lurdes Felsner

Banca examinadora: Maria de Lourdes Felsner, Elaine Tiburtius, Edgard Moreira Ganzarolli

Bibliografia

1. Química. 2. Química aplicada. 3. Foto-oxidação UV. 4. Preparo de amostras. 5. Suco de fruta. 6. Metais. 7. Espectrometria de absorção atômica em chama. 8. Validação de método. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 542

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar meu caminho e por me permitir chegar à conclusão deste trabalho.

À Professora Dra. Maria Lurdes Felsner pela orientação, paciência, disponibilidade e por todos os ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À minha família por todo o amor e por sempre me apoiar em minhas decisões. Em especial à minha mãe, meu maior exemplo de força e coragem, e meu pai, que com seu exemplo de vida me ensinou a ser persistente e correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu esposo, Sidnei, que esteve ao meu lado desde a graduação, me apoiando em todos os momentos. Por todo o amor, paciência, compreensão e por ser meu maior motivo de alegria.

Aos amigos e colegas do LabGati pelo companheirismo e pelos momentos de descontração no laboratório.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Unicentro.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As frutas e produtos derivados de seu processamento são fontes de diversos nutrientes essenciais ao organismo. Os sucos de fruta merecem destaque entre os produtos de fruta devido à sua popularidade e benefícios à saúde. O conhecimento da composição mineral desses alimentos é de grande importância para avaliar sua contribuição na dieta e para o controle de qualidade dos produtos. Porém, a maioria dos trabalhos relacionados à determinação de minerais em sucos de fruta faz uso de métodos convencionais de preparo de amostra, como a digestão por via úmida e a digestão por via seca, os quais possuem diversas desvantagens. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a otimização e validação de uma metodologia alternativa utilizando o processo de Foto-Oxidação UV no preparo de amostra para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS. A otimização das condições experimentais do processo de Foto-Oxidação UV foi realizada pela aplicação de um planejamento fatorial  $2^4$ , no qual foram avaliados o volume de  $H_2O_2$ , o pH da solução, a concentração da solução tampão e o tempo de irradiação UV, obtendo-se como resposta a absorvância das amostras a 280 nm. As condições estabelecidas pelo planejamento fatorial foram aplicadas a 14 amostras de suco de fruta, as quais foram então submetidas à determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS. Para avaliar a confiabilidade do método desenvolvido, foi realizado um estudo de validação, no qual foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão, aplicando-se testes estatísticos apropriados. Curvas analíticas de padrão externo foram utilizadas para todos os elementos analisados, as quais apresentaram linearidade adequada na faixa de concentração investigada, com coeficiente de correlação  $r > 0,99$ , valores de  $F_{regressão} \gg F_{crítico}$  e sem falta de ajuste do modelo linear ( $F_{faj} < F_{crítico}$ ). Os limites de quantificação (LQ) para o método de Foto-Oxidação UV ficaram abaixo do primeiro ponto da curva analítica e apresentaram valores menores que o método de referência (digestão por via úmida), indicando maior sensibilidade do método proposto. A precisão do método foi avaliada pela comparação com o método de referência, através de um teste- $F$  de comparação entre variâncias, o qual indicou que não existem diferenças significativas entre a precisão dos dois métodos. Também foi avaliada a precisão pela análise da repetitividade e precisão intermediária, através dos desvios padrão relativos (DPR) e do valor de Horrat, sendo que todos os valores obtidos foram inferiores aos limites estabelecidos pela AOAC (RSD (%) < 7,3 e valor de Horrat < 1,3), o que indica que o método possui precisão adequada. A exatidão foi avaliada pela comparação com o método de referência, aplicando-se um teste- $t$  pareado e a análise de regressão linear. Os resultados do teste- $t$  pareado demonstraram que não existem diferenças significativas entre os métodos utilizados para a determinação de Fe, Mn e Zn, pois em todos os casos  $t_{calculado} < t_{crítico}$ . Além disso, os resultados da regressão linear, com valores elevados de  $F_{regressão}$ , sugeriram que os teores dos metais determinados pelos dois métodos apresentam uma relação linear entre si. Também foram realizados ensaios de recuperação para os três metais analisados, obtendo-se taxas de recuperação entre 85 e 108%, as quais estão dentro do limite estabelecido pela AOAC para a faixa de concentração investigada. Esses resultados indicam que o método proposto possui exatidão adequada para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS. Sendo assim, pode-se concluir que o processo de Foto-Oxidação UV é adequado para o tratamento de amostras de suco de fruta para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS, representando uma alternativa mais simples, rápida, com menor custo e menor geração de resíduos tóxicos para o meio ambiente.

**Palavras-Chaves:** *Foto-Oxidação UV, preparo de amostras, suco de fruta, metais, espectrometria de absorção atômica em chama, validação de método.*

## ABSTRACT

The fruits and products derived from their processing are sources of several essential nutrients to the organism. Fruit juices stand out among fruit products because of their popularity and health benefits. The knowledge of mineral content of these foods is important to evaluate their contribution in diet and for quality control products. However, most of work related to minerals determination in fruit juices makes use of conventional methods of sample preparation, such as wet digestion and dry ashing, which have several disadvantages. Thus, this work aimed at the optimization and validation of an alternative method using UV Photo-Oxidation process in sample preparation for determination of Fe, Mn and Zn in fruit juices by FAAS. The optimization of experimental conditions of UV Photo-Oxidation process was carried out by application of a  $2^4$  factorial design, which evaluated the volume of  $H_2O_2$ , pH of solution, concentration of buffer solution and UV irradiation time, obtaining the absorbance of samples at 280 nm. The conditions established by factorial design were applied to 14 fruit juice samples, which were subjected to Fe, Mn and Zn determination by FAAS. In order to evaluate the reliability of the developed method, a validation study was carried out, which evaluated parameters of linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision and accuracy, applying appropriate statistical tests. Analytical curves obtained with external standard were employed for all elements analyzed, which showed adequate linearity in the concentration range investigated, with correlation coefficient  $r > 0.99$ , values of  $F_{regression} \gg F_{critical}$  and without lack of fit of linear model ( $F_{lof} < F_{critical}$ ). The limit of quantification (LOQ) values for UV Photo-Oxidation method were below the first point of calibration curve and presented lower values than reference method (wet digestion), indicating a higher sensitivity of proposed method. The method precision was evaluated by comparison with reference method through an  $F$ -test of variance comparison, which indicated that there were no significant differences in precision between both methods. The precision was also evaluated by the analysis of repeatability and intermediate precision, using the relative standard deviations (RSD) and the Horrat value, and all values obtained being lower than established by AOAC (RSD (%)  $< 7.3$  and Horrat value  $< 1.3$ ), which indicates that this method has adequate precision. Accuracy was evaluated by comparison with reference method by applying a paired  $t$ -test and linear regression analysis. The results of paired  $t$ -test demonstrated that there are no significant differences between the methods used for determination of Fe, Mn and Zn, since  $t_{calculated} < t_{critical}$ . In addition, linear regression results, with high values of  $F_{regression}$ , suggested that the metal content determined by both methods presented a linear relation between them. Recovery tests were also performed for three metals analyzed, with recovery rates between 85 and 108%, which are within the limit established by AOAC for concentration range investigated. These results indicate that the proposed method has adequate accuracy for determination of Fe, Mn and Zn in fruit juices by FAAS. Thus, it can be concluded that UV Photo-Oxidation process is suitable for the treatment of fruit juice samples for determination of Fe, Mn and Zn by FAAS, representing a simpler and faster alternative with lower cost and lower generation of toxic waste to environment.

**Palavras-Chaves:** *UV Photo-oxidation, sample preparation, fruit juice, metals, flame atomic absorption spectrometry, method validation.*

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos .....	4
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>5</b>
3.1. Frutas e Produtos de Frutas.....	5
3.1.1. Suco de Fruta.....	6
<b>3.2. Minerais Essenciais</b> .....	<b>9</b>
3.2.1. Ferro (Fe).....	10
3.2.2. Manganês (Mn) .....	11
3.2.3. Zinco (Zn) .....	12
3.2.4. Minerais nos sucos de fruta.....	13
<b>3.3. Espectrometria de Absorção Atômica</b> .....	<b>14</b>
3.3.1. Espectrometria de Absorção Atômica em Chama.....	17
<b>3.4. Preparo de amostras na determinação de minerais por FAAS</b> .....	<b>19</b>
3.4.1. Processos Oxidativos Avançados (POAs).....	21
3.4.1.1. Foto-oxidação UV .....	22
<b>3.5. Aspectos gerais sobre validação de métodos analíticos</b> .....	<b>25</b>
3.5.1. Curva analítica e Linearidade.....	26
3.5.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	28
3.5.3. Precisão .....	29
3.5.4. Exatidão.....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1. Amostragem</b> .....	<b>33</b>

<b>4.2. Materiais e Reagentes</b> .....	34
<b>4.3. Instrumentação</b> .....	34
<b>4.4. Preparo das amostras de suco de fruta</b> .....	36
4.4.1. Procedimento de preparo de amostra pelo processo de Foto-Oxidação UV .....	37
4.4.2. Avaliação dos efeitos de parâmetros experimentais sobre o processo de Foto-Oxidação UV .....	37
4.4.3. Método de referência (digestão por via úmida) .....	38
<b>4.5. Validação do método de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra</b> .....	39
4.5.1. Curvas analíticas e linearidade .....	39
4.5.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	40
4.5.3. Precisão .....	40
4.5.4. Exatidão.....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1. Avaliação dos efeitos de parâmetros experimentais sobre o processo de Foto-Oxidação UV utilizado no preparo de amostra de suco de fruta</b> .....	<b>42</b>
<b>5.2. Estudo de validação do processo de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta</b> .....	<b>51</b>
5.2.1. Curvas analíticas e linearidade .....	51
5.2.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	55
5.2.3. Precisão e Exatidão .....	56
5.2.3.1. Precisão .....	58
5.2.3.2. Exatidão .....	59
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema básico de um espectrômetro de absorção atômica (Fonte: SKOOG <i>et al.</i> , 2006).....	15
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático de uma lâmpada de cátodo oco (Fonte: HARVEY, 2000). .....	15
<b>Figura 3.</b> Processo de atomização da amostra na chama (Fonte: SKOOG <i>et al.</i> , 2006)...	17
<b>Figura 4.</b> Amostras de sucos de fruta de diferentes sabores e fabricantes (Fonte: Arquivo pessoal). .....	34
<b>Figura 5.</b> Digestor UV utilizado no preparo das amostras por Foto-Oxidação UV (Fonte: Arquivo pessoal). .....	35
<b>Figura 6.</b> Espectrofotômetro de Absorção Atômica em Chama (Fonte: Arquivo pessoal).	36
<b>Figura 7.</b> Soluções das amostras de suco de fruta no digestor UV(Fonte: Arquivo pessoal). .....	37
<b>Figura 8.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do Planejamento Fatorial $2^4$ . ....	44
<b>Figura 9.</b> Diagrama dos efeitos principais do Planejamento Fatorial $2^4$ . ....	44
<b>Figura 10.</b> Gráfico de interação entre a concentração da solução tampão e o pH.....	47
<b>Figura 11.</b> Solução da amostra de suco de uva (a) antes da irradiação UV e (b) após a irradiação UV. ....	50
<b>Figura 12.</b> Espectros de absorção molecular UV/Visível obtidos para a amostra 1 (suco de uva) antes e após o processo de Foto-Oxidação UV. ....	51
<b>Figura 13.</b> Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa menor de concentração para a determinação de Fe por FAAS.....	52
<b>Figura 14.</b> Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa maior de concentração para a determinação de Fe por FAAS. ....	53
<b>Figura 15.</b> Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa menor de concentração para a determinação de Mn por FAAS. ....	53
<b>Figura 16.</b> Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa maior de concentração para a determinação de Mn por FAAS. ....	53
<b>Figura 17.</b> Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) para a determinação de Zn por FAAS. ....	54
<b>Figura 18.</b> Comparação por regressão linear entre o processo de Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra para a determinação de Fe por FAAS. ....	61
<b>Figura 19.</b> Comparação por regressão linear entre o processo de Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra para a determinação de Mn por FAAS.....	61
<b>Figura 20.</b> Comparação por regressão linear entre o processo de Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra para a determinação de Zn por FAAS.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) de minerais.....	10
<b>Tabela 2.</b> Composição média de minerais em sucos de fruta de diferentes sabores. ....	13
<b>Tabela 3.</b> Exemplos de Processos Oxidativos Avançados (POAs). ....	22
<b>Tabela 4.</b> Valores de desvio padrão relativo (DPR) esperados em função do nível de concentração do analito. ....	29
<b>Tabela 5.</b> Valores de recuperação esperados em função da concentração do analito.....	32
<b>Tabela 6.</b> Identificação das amostras de sucos de fruta. ....	33
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros instrumentais para a determinação de Fe, Mn e Zn em amostras de sucos de fruta por FAAS. ....	36
<b>Tabela 8.</b> Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial $2^4$ .....	38
<b>Tabela 9.</b> Faixas de concentração utilizadas para as curvas de calibração na determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS .....	39
<b>Tabela 10.</b> Matriz do planejamento fatorial $2^4$ aplicado na avaliação das condições experimentais do preparo de amostra de suco de uva (amostra 1) por Foto-Oxidação UV.43	43
<b>Tabela 11.</b> Resultados do estudo do tempo de irradiação UV no processo de Foto-Oxidação UV para a determinação de Fe, Mn e Zn em suco de uva por FAAS.....	46
<b>Tabela 12.</b> Avaliação do pH da amostra 1 (suco de uva) no processo de Foto-Oxidação UV com diferentes concentrações de solução tampão pH 5 e pH 10.....	47
<b>Tabela 13.</b> Avaliação do pH das amostras de sucos de fruta submetidas ao processo de Foto-Oxidação UV. ....	49
<b>Tabela 14.</b> Efeito da variação do pH da amostra 1 (suco de uva) no processo de Foto-Oxidação UV sobre as concentrações de Fe, Mn e Zn determinadas por FAAS.....	49
<b>Tabela 15.</b> Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.....	52
<b>Tabela 16.</b> Resultados da análise de regressão linear para o estudo da linearidade na determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.....	54
<b>Tabela 17.</b> Avaliação estatística dos parâmetros $a$ e $b$ das curvas analíticas de padrão externo para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.....	55
<b>Tabela 18.</b> Resultados do estudo de sensibilidade do método para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.....	56
<b>Tabela 19.</b> Concentrações médias de Fe obtidas em amostras de suco de fruta utilizando a Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra.....	57
<b>Tabela 20.</b> Concentrações médias de Mn obtidas em amostras de suco de fruta utilizando a Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra.....	57
<b>Tabela 21.</b> Concentrações médias de Zn obtidas em amostras de suco de fruta utilizando a Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra.....	58
<b>Tabela 22.</b> Resultados do estudo de precisão do método para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS utilizando a Foto-Oxidação UV. ....	59

<b>Tabela 23.</b> Resultados do estudo de exatidão do processo de Foto-Oxidação UV para a determinação de Fe, Mn e Zn em suco de fruta por FAAS. ....	60
<b>Tabela 24.</b> Resultados da análise de regressão linear para avaliação da exatidão do processo de Foto-Oxidação UV como método de preparo de amostra. ....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AP	Calibração por adição de padrão
CV	Coefficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica em Chama)
GF AAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite)
ICP MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado)
ICP OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado)
IDR	Ingestão Diária Recomendada
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LabGati	Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRC	Material de Referência Certificado
NATA	National Association of Testing Authorities
PE	Calibração por padrão externo
PI	Precisão Intermediária
POAs	Processos Oxidativos Avançados
<i>r</i>	Repetitividade
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
$R^2$	Coefficiente de determinação

## 1. INTRODUÇÃO

As frutas e produtos de frutas são importantes fontes de diversos nutrientes essenciais, destacando-se pelo teor elevado de vitaminas, minerais e compostos antioxidantes. Por esse motivo, uma ingestão adequada desse tipo de alimento pode contribuir significativamente para a manutenção de uma vida saudável, ajudando a prevenir muitas doenças crônicas e degenerativas. Nesse sentido, diversos estudos são realizados constantemente buscando demonstrar o efeito positivo em longo prazo de uma dieta rica em frutas e verduras (KREJPCIO *et al.*, 2005; RIMM, 2002).

Entre os produtos derivados do processamento das frutas pode-se destacar o suco de fruta, o qual possui grande popularidade no mundo todo devido às características sensoriais agradáveis, além de ser fonte de hidratação e de vários nutrientes (CARNEIRO *et al.*, 2013). O consumo de sucos de frutas tem aumentado nas últimas décadas com o surgimento dos sucos industrializados de diferentes tipos e sabores, que representam maior praticidade e combinam com o ritmo de vida acelerado da sociedade atual. Com isso, torna-se necessário o monitoramento desses produtos quanto à sua contribuição nutricional, estabilidade química e físico-química e possíveis contaminações provenientes do processamento ou estocagem (SILVA *et al.*, 2005; SOARES, 2004).

Os alimentos vegetais, incluindo as frutas e seus derivados, são fontes de diversos minerais. O conhecimento da composição mineral desses alimentos é de grande importância para avaliar sua contribuição na dieta e para o controle de qualidade dos produtos. Os minerais apresentam diferentes funções no organismo e podem ser classificados como macro ou microminerais de acordo com sua essencialidade. Alguns microminerais como Fe, Mn e Zn participam de diferentes atividades metabólicas. O Fe está presente em quatro classes de proteínas e atua principalmente no transporte de oxigênio através da hemoglobina. O Mn está relacionado com o desenvolvimento dos ossos e com o metabolismo de aminoácidos, lipídios e carboidratos. O Zn atua como fator de ativação de várias enzimas e estabiliza a estrutura do DNA, RNA e ribossomos. Por outro lado, esses elementos podem apresentar efeitos tóxicos ao organismo quando presentes em excesso (GUPTA e GUPTA, 2014; MILLIKAN, 2012; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006; FRAGA, 2005).

A determinação do teor de minerais em alimentos é realizada principalmente através das técnicas de espectrometria atômica, como a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS), Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

(GF AAS) e a Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES), as quais possibilitam a determinação de vários elementos em diferentes matrizes (BRANDÃO *et al.*, 2010). A escolha da técnica adequada depende de vários fatores como o tipo e a quantidade de amostra disponível, o nível de concentração das espécies de interesse, propriedades químicas e físicas da matriz da amostra, precisão e sensibilidade do método, além do tempo e custo da análise (KORN *et al.*, 2008; SKOOG *et al.*, 2001).

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS), embora tenha sido descoberta a mais de 50 anos atrás, ainda é amplamente utilizada em laboratórios comerciais, na indústria e nas universidades. Isso se deve principalmente à sua simplicidade, robustez, seletividade e baixo custo de aquisição e manutenção quando comparada às outras técnicas (MILLIKAN, 2012; NASCENTES *et al.*, 2004).

Porém, a complexidade da matriz dificulta a determinação de minerais em alimentos através de técnicas espectrométricas, devido ao conteúdo elevado de compostos orgânicos presentes nesse tipo de amostra. Com isso, torna-se necessária, na maioria dos casos, uma etapa de preparação da amostra, a qual envolve a digestão e extração do analito, com destruição total ou parcial da matéria orgânica. Essa etapa é responsável por grande parte do erro nas análises, devido à possibilidade de perdas do analito ou contaminação da amostra. Para a mineralização das amostras normalmente são empregados os métodos de digestão por via seca ou digestão por via úmida. Essas técnicas convencionais, em geral, necessitam de um longo tempo de execução e exigem a utilização de grandes quantidades de reagentes ou altas temperaturas, o que pode levar à contaminação da amostra, provocar perdas do analito por volatilização, além de gerar resíduos tóxicos para o meio ambiente (KORN *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2003; HOENIG e KERSABIEC, 1996).

Considerando as inúmeras desvantagens relacionadas às técnicas convencionais de preparo de amostra, tem sido observado um grande interesse na busca por novas metodologias para a determinação de metais em matrizes diversas. Nesse contexto, os processos oxidativos avançados (POAs) representam uma alternativa promissora para a decomposição da matéria orgânica. Esses métodos envolvem a formação do radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), espécie altamente oxidante e reativa. A Foto-Oxidação UV é um exemplo de POA que tem sido aplicado recentemente no tratamento de amostras para análise por espectrometria atômica. Esses métodos apresentam como vantagens a redução do volume de reagentes utilizados, menor risco de contaminação e perdas do analito, menor tempo de execução e redução da quantidade de resíduos gerados, além de serem mais simples e de baixo custo (BENDICHO *et al.*, 2010; CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Apesar dessas vantagens, ainda é limitada a aplicação do processo de Foto-Oxidação UV no tratamento de amostras de alimentos para análises espectrométricas. Brandão *et al.* (2012) empregaram o processo de Foto-Oxidação UV no preparo de amostras de suco de fruta para a determinação de Cu por FAAS, obtendo resultados com precisão e exatidão adequadas. Porém, não foram encontrados outros trabalhos na literatura fazendo uso dessa técnica no tratamento de amostras de suco para a análise elementar. Também são escassos os estudos em que são empregadas novas metodologias no preparo de amostras de suco de fruta. Estes fatos despertaram o interesse no desenvolvimento de uma metodologia mais rápida e precisa para a determinação de minerais em sucos de fruta por FAAS utilizando-se o processo de Foto-oxidação UV e diferentes ferramentas quimiométricas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Otimizar e validar uma metodologia de preparo de amostra utilizando o processo de Foto-Oxidação UV para a determinação de minerais essenciais em sucos de fruta por FAAS.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Otimizar o preparo de amostra pelo processo de Foto-Oxidação UV para análise de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS utilizando técnicas de planejamento de experimentos;
- Validar o método otimizado para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS pela aplicação de diferentes testes estatísticos (teste-*t*, ANOVA, teste-*F* e regressão linear) e comparação com o método de referência (digestão por via úmida);
- Determinar os teores dos minerais essenciais Fe, Mn e Zn em amostras de sucos de fruta de diferentes sabores e fabricantes pelo método validado.



### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Frutas e Produtos de Frutas

As frutas são alimentos essenciais para uma dieta saudável, pois são fontes de diversos nutrientes como vitaminas, carotenóides, minerais, fibras alimentares e vários tipos de antioxidantes. A contribuição nutricional vai depender do tipo de fruta, da quantidade consumida diariamente e da quantidade de compostos biologicamente ativos. Entretanto, a qualidade das frutas diminui com a presença de pesticidas, metais pesados e outras substâncias tóxicas provenientes de seu cultivo inadequado (KREJPCIO *et al.*, 2005; HOE e SIONG, 1999).

Vários estudos indicam que a ingestão regular de frutas e verduras pode ajudar a diminuir o risco de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, alguns tipos de câncer e outras doenças crônicas e degenerativas. Isso se deve à grande quantidade de compostos antioxidantes presentes nesses alimentos, como ácido ascórbico (Vitamina C), carotenóides e compostos fenólicos (BAZZANO *et al.*, 2002; RIMM, 2002; WANG *et al.*, 1996).

As frutas possuem grande quantidade de compostos fenólicos em sua composição, especialmente flavonóides (incluindo flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas, catequinas e isocatequinas). Além da atividade antioxidante, esses compostos contribuem para a qualidade sensorial das frutas (cor, adstringência, amargura e sabor). Sua concentração varia de acordo com a espécie, grau de maturação e condições ambientais de crescimento, maturação e armazenamento (REKHA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 1996; SIMÓN *et al.*, 1992).

Em geral, o consumo de frutas é baixo em diversos países, apesar dos benefícios associados a esses produtos. Diversos fatores contribuem para o consumo crescente de produtos industrializados, que representam uma alternativa mais fácil e atrativa aos consumidores. Com isso, o consumo de alimentos *in natura*, como frutas e vegetais, diminui cada vez mais. Essa tendência mundial ao consumo de dietas hipercalóricas, ricas em açúcares e gorduras, aumenta a incidência de doenças como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (LIMA e MENDES, 2013; BARROS, 2008; DARMON *et al.*, 2005). Por esse motivo, o consumo de frutas e hortaliças tem sido estimulado em vários países, com o incentivo à população pela busca de hábitos mais saudáveis e naturais (SANTOS, 2015).

O Brasil tem se destacado mundialmente como grande produtor de frutas, incluindo frutas tropicais e subtropicais, como mamão, manga, maracujá, abacaxi, banana, goiaba, frutas cítricas, entre outras. Nesse sentido, a indústria de alimentos procura inovações que

possibilitem maior aproveitamento e conservação desses produtos para a comercialização. Para isso é importante que se tenha o tratamento adequado desde o momento da colheita das frutas, incluindo boas práticas durante o manuseio, armazenamento e transporte (SANTOS, 2015; CENCI, 2006; SBRT, 2006).

Diversos produtos podem ser obtidos a partir do processamento das frutas, como sucos, doces, geléias, frutas em calda, frutas desidratadas, entre outros. Esses produtos conservam grande parte das propriedades nutricionais da fruta de origem e podem contribuir também para uma alimentação saudável (KREJPCIO *et al.*, 2005). A qualidade dos produtos processados depende muito dos tratamentos realizados antes e durante o beneficiamento da matéria-prima. Dessa forma, o processo de obtenção dos produtos de frutas passa por várias etapas, como manejo, pós-colheita, seleção, lavagem, sanitização, corte, enxágue, descascamento, cocção, secagem, centrifugação, embalagem e armazenamento. Além disso, o tipo de processamento utilizado vai depender da espécie, da variedade e das características físicas e físico-químicas da fruta a ser processada (SANTOS, 2015; SANTOS E OLIVEIRA, 2015).

### 3.1.1. Suco de Fruta

Um dos produtos de frutas de maior popularidade no mundo todo é o suco de fruta, cujo consumo aumentou rapidamente nas últimas duas décadas por ser uma bebida de características sensoriais agradáveis, além de proporcionar efeitos benéficos à saúde (SZYMCZYCHA-MADEJA *et al.*, 2014; FERRAREZI *et al.*, 2010).

Considerando a legislação para bebidas não-alcoólicas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define suco como sendo a “bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo”, sendo considerado integral o suco sem adição de açúcares e na sua concentração natural. Quando adoçado, a quantidade de açúcar nos sucos não deve exceder um limite de 10% do total em peso, e nesse caso o produto recebe a denominação de suco adoçado. Além disso, é proibida a adição de aromas e corantes artificiais (BRASIL, 2009; BRASIL, 1994).

Os sucos devem apresentar coloração, odor e sabor característicos de cada fruta, sendo que a composição e o valor nutricional variam de acordo com a espécie, maturidade e condições de cultivo da fruta. Eles são compostos principalmente de água, açúcares (glicose e frutose), ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico, tartárico, fumárico, succínico,

entre outros), compostos fenólicos, compostos nitrogenados (aminoácidos, polipeptídeos e proteínas) e diversos minerais. A acidez dos sucos se deve à presença dos ácidos orgânicos, que lhes conferem um pH baixo, em torno de 2 a 3, e garantem um equilíbrio entre os sabores doce e ácido (PINHEIRO *et al.*, 2006; RIZZON e LINK, 2006; CHINNICI *et al.*, 2005).

O processamento de sucos envolve etapas de pré-tratamento, tratamento e conservação. Primeiramente, é feita uma seleção cuidadosa da matéria-prima, que deve estar em fase de maturação adequada e livre de contaminações aparentes, podridões e lesões físicas. Em seguida, esta deve ser lavada em água corrente para remoção de sujidades e sanitizada com água clorada. Após a higienização, as frutas passam por processos de descascamento, trituração e despulpamento. Na sequência, o produto é submetido ao branqueamento, para inibir ou minimizar as transformações enzimáticas e reduzir a carga microbiana, e à clarificação, refino ou finisher, que consiste em reduzir ou eliminar o teor de sólidos insolúveis em suspensão no suco. Para a conservação são utilizadas principalmente as técnicas de pasteurização, que eliminam os microorganismos patogênicos, e concentração térmica, na qual há redução da atividade de água do produto (SANTOS, 2015; SANTOS E OLIVEIRA, 2015).

Os sucos de fruta integrais normalmente são envasados em garrafas de vidro, em embalagens cartonadas ou em embalagens de poliestireno tereftalato (PET) e, na maioria dos casos, devem ser diluídos e adicionados de açúcar antes do consumo (SANTOS E OLIVEIRA, 2015).

Além dos sucos integrais, existem diferentes tipos de sucos industrializados disponíveis comercialmente, os quais possuem diferentes denominações de acordo com a legislação brasileira para bebidas. A principal característica que diferencia esses produtos está relacionada com o teor de fruta ou polpa de fruta, utilizado em sua fabricação. Os sucos devem atender à legislação específica, estando de acordo com a definição, classificação, registro, padronização e requisitos de qualidade, devendo também atender à legislação sobre rotulagem de alimentos embalados (FERRAREZI *et al.*, 2010).

Quando o suco de fruta é parcialmente desidratado ele deve ser denominado suco concentrado. Já o suco desidratado é o suco no estado sólido, obtido pela desidratação do suco integral. Quando são reconstituídos, os sucos concentrado e desidratado devem conter os teores de sólidos solúveis originais do suco integral ou o mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco (BRASIL, 2009).

A polpa de fruta é obtida pelo esmagamento de frutos polposos por meio de processos tecnológicos adequados. São consideradas frutas polposas de origem tropical o abacate, abacaxi, acerola, ata, abricó, açaí, abiu, banana, bacuri, cacau, caju, cajá, carambola, cupuaçu, goiaba, graviola, jenipapo, jabuticaba, jaca, jambo, mamão, mangaba, manga, maracujá, melão, murici, pinha, pitanga, pupunha, sapoti, serigüela, tamarindo, taperebá, tucumã e umbu. A produção de polpas de frutas congeladas representa uma importante alternativa para o aproveitamento dos frutos durante a safra, permitindo sua estocagem fora da época de produção dos frutos *in natura* (SANTOS E OLIVEIRA, 2015; BRUCH, 2012; BRASIL, 2000).

A partir das frutas polposas pode ser preparado também o suco tropical. Este é obtido pela dissolução em água potável da polpa de fruta polposa de origem tropical por meio de processo tecnológico adequado. A quantidade mínima de polpa estabelecida para o suco tropical varia de acordo com a fruta e, em geral, deve ser superior ao estabelecido para o néctar da respectiva fruta. Se não for fixada em Regulamento Técnico específico, o suco tropical deve conter um mínimo de 50% (m/m) de polpa de fruta. Já nos casos de frutas com acidez alta, conteúdo de polpa muito elevado ou sabor muito forte, o conteúdo de polpa não deve ser inferior a 35% (m/m). Existem também o suco misto e o suco tropical misto, que são obtidos pela mistura de duas ou mais frutas, as quais devem ser especificadas no rótulo do produto em ordem decrescente das quantidades presentes na mistura (BRUCH, 2012; BRASIL, 2009; BRASIL, 2003).

Além dos sucos, existem outras bebidas não-alcoólicas a base de fruta com menor teor de polpa e com adição de água, açúcar e outros aditivos como acidulante, antioxidante, corante, aromatizante, estabilizante, conservante, espessante, entre outros. O principal exemplo é o néctar, ou suco pronto para beber, que tem se tornado cada vez mais popular no mercado brasileiro. Ele é obtido pela diluição em água potável da parte comestível da fruta, adicionado de açúcares e outros aditivos, e é destinado ao consumo direto. Assim como no suco tropical, o teor de polpa no néctar varia de acordo com a fruta utilizada. No caso do néctar de uva ou de laranja, por exemplo, é exigida uma quantidade mínima de 50% de polpa ou suco. Para as outras frutas o teor de polpa exigido é menor. De modo geral, quando não estiver fixado em regulamento, o teor mínimo de polpa de fruta é de 30% (m/m), exceto no caso de frutas com elevada acidez ou conteúdo de polpa, nos quais o teor de polpa não deve ser inferior a 20% (m/m) (BRASIL, 2012; BRUCH, 2012; FERRAREZI *et al.*, 2010; BRASIL, 2009; BRASIL, 2003).

Outro exemplo de bebida a base de fruta é o refresco, que é semelhante ao néctar, porém com menor teor de polpa ou suco de fruta, o qual pode variar de 0,02 (para refresco de guaraná) a 30% (v/v) (para refrescos de uva, laranja, abacaxi e tangerina). Quando não for especificado em regulamento, a quantidade mínima de polpa ou suco de fruta deve ser de 10% (v/v). Também existem alguns refrigerantes a base de fruta, que são obtidos pela dissolução em água potável de suco de fruta com adição de açúcar e dióxido de carbono, além de outros aditivos. O teor de suco de fruta pode ser semelhante ao do refresco ou menor, de acordo com a fruta utilizada, sendo que a quantidade máxima é de 10% (v/v) de suco (BRASIL, 2013; BRUCH, 2012; BRASIL, 2009; BRASIL, 1998).

### **3.2. Minerais Essenciais**

Os minerais são substâncias inorgânicas encontradas na natureza na forma de óxidos, carbonatos, sulfatos, fosfatos, entre outros. Alguns desses minerais, considerados essenciais, estão presentes no organismo combinados com constituintes orgânicos (aminoácidos, enzimas, proteínas, hormônios) na forma de quelatos. Esses minerais são obtidos através da alimentação e estão presentes em todos os tecidos e fluidos corporais, exercendo importantes funções metabólicas e estruturais (GUPTA e GUPTA, 2014; SOETAN *et al.*, 2010; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008).

Os minerais podem ser classificados em dois grupos de acordo com sua essencialidade e quantidade encontrada no organismo. Os macrominerais incluem elementos como cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P), cuja necessidade de ingestão é maior que 100 mg por dia. Já os microminerais ou traços são necessários em menores quantidades e incluem elementos como cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe), cromo (Cr), selênio (Se), iodo (I) e molibdênio (Mo) (GUPTA e GUPTA, 2014; SOETAN *et al.*, 2010; SPADA *et al.*, 2010). Os valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) variam de acordo com o mineral e faixa etária. A Tabela 1 apresenta os valores de IDR de minerais para diferentes faixas etárias segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

**Tabela 1.** Valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) de minerais.

Mineral	IDR				
	Lactentes (0 a 11 meses)	Crianças (1 a 10 anos)	Gestantes	Lactantes	Adultos
Ca (mg)	300-400	500-700	1200	1000	1000
Fe (mg)	0,27-9	6-9	27	15	14
Mg (mg)	36-53	60-100	220	270	260
Zn (mg)	2,8-4,1	4,1-5,6	11	9,5	7
I (µg)	90-135	75-100	200	200	130
P (mg)	100-275	460-1250	1250	1250	700
F (mg)	0,01-0,5	0,7-2	3	3	4
Cu (µg)	200-220	340-440	1000	1300	900
Se (µg)	6-10	17-21	30	35	34
Mo (µg)	2-3	17-22	50	50	45
Cr (µg)	0,2-5,5	11-15	30	45	35
Mn (mg)	0,003-0,6	1,2-1,5	2,0	2,6	2,3

(Fonte: BRASIL, 2005)

Os microminerais desempenham diferentes funções em sistemas biológicos e são encontrados em grande parte ligados às proteínas, formando metaloproteínas. Dessa forma, muitos deles fazem parte de sistemas enzimáticos, possuem funções estruturais e de armazenamento, ou utilizam a proteína para serem transportados a um determinado local do organismo. Entretanto, a ingestão de minerais traço deve ser controlada, devido ao efeito tóxico associado a esses elementos quando presentes em excesso no organismo (FRAGA, 2005; ONIANWA, 2001; ONIANWA *et al.*, 1999). Nesse sentido, é importante determinar o teor de microminerais em alimentos para garantir uma ingestão adequada desses nutrientes. Nesse trabalho foram investigados os elementos Fe, Mn e Zn, os quais são descritos a seguir quanto à sua função e toxicidade no organismo.

### 3.2.1. Ferro (Fe)

O Fe é um micronutriente essencial para muitas atividades celulares e indispensável para o bom funcionamento do organismo. Devido à capacidade de alternância entre os dois estados de oxidação ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ), o Fe pode servir como um co-fator para as enzimas envolvidas nas reações de oxidação-redução. Sua principal função em sistemas biológicos está relacionada ao transporte de oxigênio pelo sangue como constituinte da hemoglobina. Também faz parte da mioglobina, proteína ligadora de oxigênio nas células musculares, e dos citocromos, complexos protéicos envolvidos no processo de respiração celular e

geração de energia (TOGNON, 2012; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008; WHITNEY e ROLFES, 2008; FRAGA e OTEIZA, 2002).

A absorção do Fe pelo organismo ocorre, em grande parte, pela ferritina, uma proteína de estocagem que recebe o Fe dos alimentos e o armazena nas células da mucosa do intestino delgado. Quando o organismo precisa de Fe, uma parte é liberada para a transferrina, que transporta o mineral para o resto do corpo (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008; WHITNEY e ROLFES, 2008).

A carência de Fe no organismo pode ocorrer devido a perdas excessivas, má absorção ou pela ingestão diária insuficiente. A principal consequência da deficiência de Fe é a anemia ferropriva, que afeta principalmente crianças e mulheres na idade reprodutiva (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008; COSTA, 2012). Por outro lado, o excesso de Fe no organismo, apesar de pouco freqüente, também pode causar patologias, incluindo doenças no fígado e no coração, câncer, desordem neurodegenerativa, diabetes e anormalidades hormonais e imunológicas. Essas condições podem ocorrer devido à ingestão elevada de Fe através de suplementos alimentares, transfusões de sangue freqüentes ou, principalmente, devido à hemocromatose primária, causada por um distúrbio genético que aumenta a absorção de Fe no intestino (WHITNEY e ROLFES, 2008; FRAGA e OTEIZA, 2002).

A principal fonte alimentar de Fe é o fígado, seguido por carne vermelha em geral, frutos do mar e aves. As principais fontes vegetais são os feijões secos e hortaliças, além de frutas e cereais (COSTA, 2012; TOGNON, 2012).

### 3.2.2. Manganês (Mn)

O corpo humano contém cerca de 20 mg de Mn, sendo que a maior parte é encontrada nos ossos. O Mn atua como co-fator de diversas enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores e metabolismo e é transportado no corpo pela transferrina e pelas macroglobulinas e albumina. Ele está associado com o desenvolvimento dos ossos e cartilagens e com o metabolismo de aminoácidos, lipídios e carboidratos. Também atua como ativador de enzimas relacionadas à síntese de tecidos conjuntivos, regulação de glicose no sangue, proteção das células contra radicais livres e atividades neuro-hormonais (BOWMAN *et al.*, 2011; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008; WHITNEY e ROLFES, 2008; FRAGA, 2005).

A necessidade de manganês no organismo é baixa e é suprida facilmente através da alimentação, portanto a deficiência desse mineral é rara. No entanto, alguns fatores da

dieta, como os fitatos, inibem sua absorção. Além disso, altas ingestões de Fe e Ca através de suplementação também limitam a absorção de Mn. A falta desse mineral no organismo pode interferir no crescimento e causar anormalidades no esqueleto, disfunções reprodutivas, problemas no metabolismo de lipídios e carboidratos e menor tolerância à glicose. A principal fonte de Mn na dieta são os cereais integrais, além de nozes, leguminosas, gengibre, abacaxi e chás (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008; WHITNEY e ROLFES, 2008; FAIRWEATHER-TAIT e HURRELL, 1996)

A absorção de Mn pelo organismo se dá principalmente através da ingestão dietética, mas também através da inalação e absorção dérmica. Apesar de sua importância nas funções metabólicas, a exposição excessiva a esse elemento gera efeito cumulativo no cérebro. Esse fato tem sido associado com disfunções no sistema de gânglios basais, que causa sérios problemas neurológicos semelhantes à doença de Parkinson (BOWMAN *et al.*, 2011; ASCHNER, 2000; RABIN *et al.*, 1993).

### 3.2.3. Zinco (Zn)

O Zn é o segundo micromineral mais abundante no organismo (perdendo apenas para o Fe) e se encontra distribuído por todas as células. O corpo humano possui cerca de 2 a 3 g de Zn, sendo que as maiores concentrações se encontram nos músculos e nos ossos. Ele atua como fator de ativação de várias enzimas, estabiliza a estrutura do DNA, RNA e ribossomos e exerce influência sobre o metabolismo hormonal, participando, por exemplo, da síntese, armazenamento e liberação da insulina no pâncreas. Também auxilia na função imunológica, no crescimento e no desenvolvimento. É essencial para a percepção normal do paladar, para a cicatrização de feridas, para a produção de espermatozóides e para o desenvolvimento fetal (TOGNON, 2012; WHITNEY e ROLFES, 2008; SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006).

As principais fontes de Zn são os alimentos ricos em proteínas, como mariscos (especialmente ostras), carnes, aves e fígado, além de leguminosas, cereais integrais, feijão, nozes e laticínios (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008; WHITNEY e ROLFES, 2008; FRAGA, 2005).

O Zn presente nos alimentos é absorvido pelo organismo no intestino delgado e armazenado pela metalotioneína, a qual libera a quantidade necessária no sangue para que seja transportada pelo corpo. O transporte do Zn é realizado pela proteína albumina e uma parte pela transferrina (que faz o transporte de Fe pelo organismo). (WHITNEY e ROLFES, 2008; FAIRWEATHER-TAIT e HURRELL, 1996). A taxa de absorção do Zn



no organismo é afetada por diversos fatores. Substâncias orgânicas solúveis e de baixo peso molecular, como os aminoácidos e ácidos orgânicos, facilitam a absorção de Zn. Por outro lado, outros compostos orgânicos, como os fitatos, presentes em grande quantidade nos alimentos vegetais, inibem a absorção de Zn. Outros inibidores incluem o álcool, taninos, alguns antibióticos e contraceptivos orais. Além disso, a biodisponibilidade do Zn depende também de sua interação com outros minerais no intestino (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2008; WHITNEY e ROLFES, 2008; FAIRWEATHER-TAIT e HURRELL, 1996).

A deficiência de Zn no organismo causa sérios problemas, como déficit do crescimento, hipogonadismo, dermatites, deficiência do sistema imunológico, diarreia e dificuldade na cicatrização de feridas. Já o excesso desse mineral causa vômitos, diarreia, dores de cabeça, exaustão e outros sintomas. A toxicidade do Zn pode causar também efeitos adversos crônicos como deficiência na resposta imunológica, redução da concentração de cobre e alteração nas funções do ferro e no metabolismo do colesterol (TOGNON, 2012; WHITNEY e ROLFES, 2008; SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006; ONIANWA, 2001).

#### 3.2.4. Minerais nos sucos de fruta

Os sucos de fruta são ricos em diversos minerais essenciais, destacando-se pelo elevado teor de K, sendo que a composição varia bastante entre eles de acordo com a fruta, proveniência e tipo de processamento utilizado (RIZZON e LINK, 2006; FERREIRA *et al.*, 2002). Na Tabela 2 são apresentados os teores médios de alguns minerais em sucos de frutas de diferentes sabores de acordo com trabalhos encontrados na literatura.

**Tabela 2.** Composição média de minerais em sucos de fruta de diferentes sabores.

Sabor	Teor de minerais (µg/g)							
	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
Abacaxi	2460	182	299	208	8,5	2,6	6,0	0,8
Acerola	1040	208	72	80	16,0	0,8	1,0	0,3
Caju	1150	364	7,0	91	2,9	1,0	0,7	0,5
Goiaba	1400	200	36	49	6,7	1,8	0,9	0,4
Maçã	1013	2,1	16,1	31,9	0,4	0,6	0,5	0,8
Manga	1400	172	53	102	1,8	2,4	1,6	0,6
Maracujá	2380	202	41	101	4,3	7,0	1,1	0,7
Pitanga	700	189	42	50	5,6	0,7	0,3	0,3
Uva	1530	3,2	68,9	64,5	0,8	0,2	0,6	3,0

(FONTES: RIZZON e LINK, 2006; RIZZON *et al.* 2005; SOARES *et al.*, 2004)

Considerando o consumo elevado de sucos de fruta no mundo todo, o conhecimento da composição mineral desse tipo de bebida é de grande importância para avaliar sua qualidade e contribuição nutricional, além de assegurar que estes produtos estejam livres de contaminações (SZYMCZYCHA-MADEJA e WELNA, 2013; KREJPCIO *et al.*, 2005). De acordo com Despina-Maria *et al.* (2011), a composição mineral e a determinação da umidade podem ser utilizadas como marcadores de qualidade das frutas e seus produtos para os produtores e também para as indústrias alimentares de processamento. Além dos elementos essenciais, a presença de elementos tóxicos, como Pb e Cd, provenientes de pesticidas e contaminações ambientais, pode comprometer a qualidade dos produtos de fruta (KREJPCIO *et al.*, 2005).

Para a determinação da concentração de minerais essenciais em sucos de fruta são utilizadas principalmente as técnicas espectroquímicas, como a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS), a Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS), a Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) e a Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP MS) (SZYMCZYCHA-MADEJA *et al.*, 2014; SZYMCZYCHA-MADEJA e WELNA, 2013).

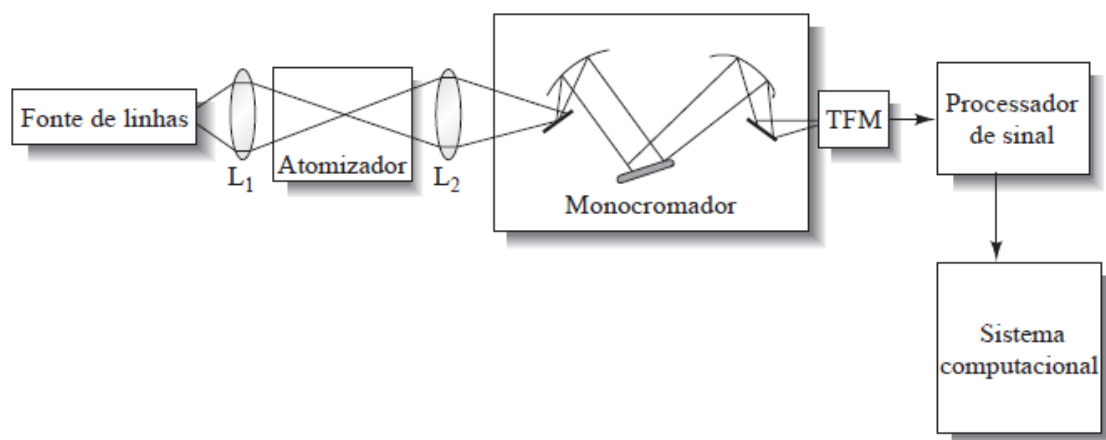
### **3.3. Espectrometria de Absorção Atômica**

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) é a mais utilizada para a determinação de vários elementos em amostras biológicas, ambientais, geológicas e de alimentos devido à sua simplicidade, efetividade e custo relativamente baixo. Ela foi proposta inicialmente por Alan Walsh em 1955, porém só foi completamente aceita pela comunidade científica a partir de 1960, quando começaram a surgir os primeiros espectrômetros comerciais (MILLIKAN, 2012; BRANDÃO, 2010; AMORIN *et al.*, 2008).

A técnica de AAS está baseada no fenômeno de absorção de energia radiante por átomos livres no estado gasoso quando estes são irradiados por uma fonte de radiação apropriada. A absorção atômica obedece à lei de Lambert-Beer, que estabelece que a absorbância (logaritmo negativo do fator de transmissão) é proporcional à concentração do elemento absorvente (ROUESSAC e ROUESSAC, 2007; WELZ, 1994).

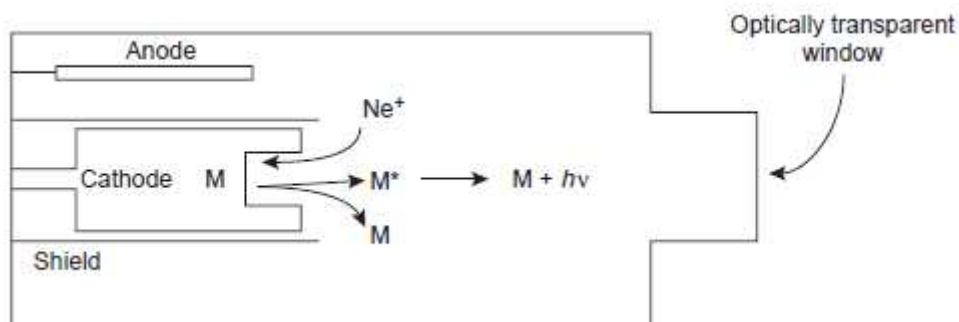
A instrumentação para a técnica de AAS é relativamente simples, conforme está representado na Figura 1. O equipamento é composto principalmente por uma fonte de radiação eletromagnética, um atomizador, um monocromador, um detector, um

processador de sinal e um sistema computacional para fornecer os dados (SKOOG *et al.*, 2006; WELZ, 1994).



**Figura 1.** Esquema básico de um espectrômetro de absorção atômica (Fonte: SKOOG *et al.*, 2006).

A fonte de radiação fornece radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico a ser absorvido pelos átomos do elemento a ser determinado. A lâmpada de cátodo oco (Figura 2) é a fonte de radiação mais utilizada para AAS (TOGNON, 2012; HARVEY, 2000).



**Figura 2.** Diagrama esquemático de uma lâmpada de cátodo oco (Fonte: HARVEY, 2000).

Esta lâmpada é composta por um ânodo de tungstênio e um cátodo cilíndrico feito com o metal do analito ou recoberto por esse metal. O cátodo é selado em um tubo de vidro contendo um gás inerte, como o argônio ou neônio. Quando um potencial é aplicado através do eletrodo, o gás é ionizado pelo ânodo. Em seguida, os íons carregados positivamente se chocam contra a superfície do cátodo carregado negativamente, provocando o processo de *sputtering*, no qual alguns átomos do metal são desalojados e

produzem uma nuvem atômica. Alguns dos átomos metálicos removidos se encontram no estado excitado e emitem radiação característica do metal quando retornam ao estado fundamental (HARVEY, 2000; ROBINSON, 1982). Existem também lâmpadas de cátodo oco multielementares, cujo cátodo contém mais de um elemento, possibilitando a determinação de diversas espécies utilizando a mesma lâmpada (SNEDDON, 1997).

Outro tipo de lâmpada utilizada em AAS é a lâmpada de descarga sem eletrodo, que é mais intensa que a de cátodo oco. Elas são feitas com um tubo de quartzo selado contendo um gás inerte e uma pequena quantidade do metal do analito (ou de seu sal). Esta lâmpada não possui eletrodo, sendo energizada por um campo intenso de radiofrequência ou radiação de micro-ondas. Ela é utilizada particularmente para a determinação de elementos com As, Se e Te, para os quais as lâmpadas de cátodo oco apresentam baixa sensibilidade (ROUESSAC e ROUESSAC, 2007; SKOOG *et al.*, 2006).

O atomizador é responsável por gerar átomos gasosos no estado fundamental do elemento de interesse a partir de íons e moléculas presentes na amostra, para que então eles possam absorver a radiação eletromagnética emitida pela lâmpada (TOGNON, 2012; WELZ, 1994). A etapa de atomização é considerada a mais importante em análises por AAS. Para isso, diferentes tipos de atomizadores podem ser empregados, sendo que a chama e o tubo de grafite são os mais utilizados (BRANDÃO, 2010).

A lâmpada de catodo oco contendo o elemento a ser determinado emite radiação eletromagnética em uma estreita faixa de comprimentos de onda. Dessa forma, é necessário selecionar um comprimento de onda específico para ser utilizado nas determinações, de acordo com a sensibilidade desejada. Essa função é realizada pelo monocromador, que separa a linha espectral de interesse das outras linhas emitidas pela lâmpada, utilizando para isso um prisma ou rede de difração associado a duas fendas estreitas que servem para a entrada e saída da radiação (TOGNON, 2012; SNEDDON, 1997).

O detector possui a função de medir a intensidade de radiação não absorvida pelo analito e converter em sinais elétricos. Os detectores normalmente utilizados em AAS são os tubos fotomultiplicadores, os quais contêm uma superfície fotossensível que absorve radiação no ultravioleta, visível e infravermelho próximo, produzindo uma corrente elétrica proporcional ao número de fótons que atingem o transdutor (HARVEY, 2000; SNEDDON, 1997).

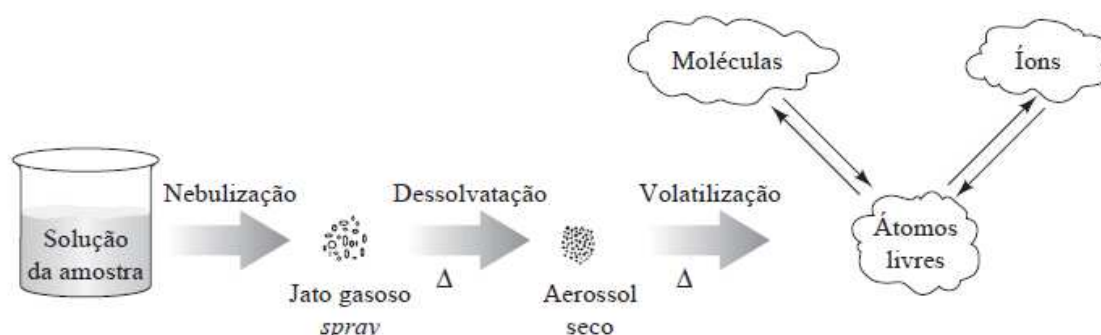
A Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) e a Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS) são os principais exemplos de técnicas

de AAS. A diferença entre elas é basicamente a instrumentação utilizada, em especial o tipo de atomizador (chama ou tubo de grafite), o que influencia na sensibilidade da técnica (TOGNON, 2012).

### 3.3.1. Espectrometria de Absorção Atômica em Chama

A Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) foi a primeira técnica de AAS a ser utilizada e é considerada uma técnica analítica bem sucedida até os dias de hoje. O primeiro equipamento de FAAS a ser fabricado remete ao ano de 1960. Apesar disso, a técnica continua sendo a mais utilizada na determinação de metais em matrizes diversas por sua simplicidade, boa seletividade, robustez e baixo custo de aquisição e operação, quando comparada com outras técnicas (MILLIKAN, 2012; DIONÍSIO *et al.*, 2011; AMORIN *et al.*, 2008; NASCENTES *et al.*, 2004).

O equipamento de FAAS é composto por um atomizador de chama que contém um nebulizador pneumático. Nesse tipo de atomizador, a solução da amostra é introduzida de forma contínua. O processo de atomização está representado na Figura 3. Quando a amostra é aspirada, ela é convertida em uma névoa ou aerossol para então ser introduzida no queimador. A alta temperatura da chama causa a evaporação do solvente, formando um aerossol de partículas secas que então são volatilizadas, produzindo espécies atômicas, moleculares e iônicas (SKOOG *et al.*, 2006; PATNAIK, 2004).



**Figura 3.** Processo de atomização da amostra na chama (Fonte: SKOOG *et al.*, 2006).

A chama é composta por uma mistura de gases (oxidante e combustível), cuja composição e proporção variam de acordo com o elemento a ser analisado. O gás combustível mais utilizado na técnica de FAAS é o acetileno ( $C_2H_2$ ) e como oxidante normalmente são utilizados ar ou óxido nítrico ( $N_2O$ ). A mistura  $C_2H_2$ /ar atinge temperaturas entre 2100 e 2400°C e é utilizada para elementos que são atomizados com

mais facilidade. Já a mistura  $C_2H_2/N_2O$  com atmosfera redutora atinge temperaturas maiores, entre 2600 e 2800°C, e é utilizada para elementos que formam óxidos refratários (PATNAIK, 2004; SKOOG *et al.*, 2001; WELZ, 1994).

A amostra a ser analisada por FAAS deve estar em forma de solução preferencialmente límpida, sem material particulado em suspensão. Mesmo assim, a análise por FAAS está sujeita a interferências espectrais ou não espectrais, que afetam a precisão analítica (TOGNON, 2012).

A interferência espectral ocorre quando outra espécie presente na amostra absorve radiação em um comprimento de onda muito próximo da banda de absorção do elemento a ser determinado. Porém, esse tipo de interferência raramente ocorre em AAS e pode ser eliminada pela escolha de outra linha de absorção do elemento ou pelo uso de corretor de fundo (HARVEY, 2000; CANTLE, 1982).

As interferências não espectrais incluem interferências químicas, físicas e de ionização, as quais influenciam na intensidade do sinal do analito. As interferências físicas podem alterar os processos de aspiração, nebulização, dessolvatação e volatilização do analito (SKOOG *et al.*, 2006).

As interferências químicas são as mais comuns em AAS e ocorrem pela presença de espécies que impedem ou suprimem a formação de átomos no estado fundamental na chama. O exemplo mais comum é a interferência causada pela presença de aluminatos, silicatos e fosfatos na determinação de elementos como Mg, Ca, Sr e Ba, os quais podem formar compostos difíceis de serem volatilizados na chama. Isso pode ser evitado pela utilização de agentes de proteção, que previnem a interferência pela formação de espécies estáveis, porém voláteis, com o analito, ou de agentes liberadores, os quais reagem preferencialmente com o interferente e previnem sua interação com o analito. Outra alternativa é a utilização de uma chama de maior temperatura, como a de  $C_2H_2/N_2O$  (ROUESSAC e ROUESSAC, 2007; HARVEY, 2000; CANTLE, 1982).

A interferência de ionização ocorre quando o analito é facilmente ionizado devido à alta temperatura da chama, diminuindo a concentração de átomos no estado fundamental desse elemento. Para evitar esse problema pode ser utilizado um supressor de ionização (como K, Na, Li, Cs ou Rb), que é uma espécie com menor energia de ionização que produz uma alta concentração de elétrons na chama, o que desloca o equilíbrio de ionização do analito favorecendo a formação de átomos neutros (SKOOG *et al.*, 2006; HARVEY, 2000).

A técnica de FAAS é amplamente utilizada na determinação de minerais em alimentos e bebidas. Para isso, devido à complexidade da matriz, faz-se necessária uma etapa de preparação da amostra, com a decomposição total ou parcial da matéria orgânica e a extração dos analitos (KORN *et al.*, 2008; BULDINI *et al.*, 2002).

### **3.4. Preparo de amostras na determinação de minerais por FAAS**

Dentro do protocolo analítico, existem várias etapas a serem seguidas. Entre elas, a preparação da amostra é uma das mais importantes e define boa parte do tempo e custo da análise. Também pode ser a principal fonte de erro nas análises, devido à dissolução incompleta da matriz, volatilização do analito ou contaminação por reagentes e vidrarias (BRANDÃO, 2010; OLIVEIRA, 2003; BULDINI *et al.*, 2002; HOENIG e KERSABIEC, 1996).

Para o preparo de amostras de alimentos normalmente são empregados os métodos de digestão por via seca ou por via úmida, com aquecimento em sistemas abertos ou fechados e utilizando diferentes formas de energia. Essas técnicas são, normalmente, bastante demoradas, necessitam de grandes volumes de reagentes ou temperaturas muito elevadas, o que causa contaminação da amostra e perdas do analito por volatilização, além de gerarem resíduos tóxicos para o meio ambiente (OLIVEIRA, 2003; BULDINI *et al.*, 2002).

Na digestão por via seca a matéria orgânica é totalmente eliminada através da calcinação da amostra a altas temperaturas (400-550°C), resultando em uma mistura de óxidos e carbonatos, que devem ser dissolvidos em um ácido apropriado. Esse método pode ser aplicado a diferentes amostras e possibilita a determinação de vários metais, com exceção dos mais voláteis, como As, Hg e Se. A temperatura de calcinação utilizada depende da matriz da amostra e dos elementos a serem determinados e deve ser ajustada de forma a evitar perdas por volatilização, que é o principal problema envolvido nessa técnica. Para elementos como Pb e Cd geralmente se faz necessária a utilização de aditivos (nitrito de magnésio, ácido sulfúrico, carbonato de sódio) que previnem a volatilização desses metais. Esse fator pode contribuir para a contaminação da amostra, além de aumentar a concentração de sais inorgânicos, o que pode ser um grande problema na determinação de elementos traço. Outros problemas relacionados à digestão por via seca envolvem a possibilidade de retenção do analito na superfície do recipiente utilizado, a extração incompleta das cinzas, a contaminação da amostra pelo ambiente e o longo tempo de execução (FSSAI, 2012; KORN *et al.*, 2008; HOENIG e KERSABIEC, 1996).

A digestão por via úmida consiste na decomposição da matéria orgânica presente nas amostras por meio de agentes oxidantes e aquecimento em chapa elétrica ou blocos digestores. Os reagentes normalmente utilizados são ácidos concentrados, como ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido perclórico, ácido clorídrico e ácido fluorídrico, e peróxido de hidrogênio, podendo ser utilizadas combinações desses reagentes. A escolha dos agentes oxidantes depende da composição da amostra e do método instrumental que será utilizado na determinação de metais, e deve ser levada em consideração a força do ácido, seu poder de oxidação, ponto de ebulição, pureza e segurança na manipulação, além da solubilidade dos sais resultantes da digestão. O ácido nítrico é o mais utilizado como oxidante primário na digestão por via úmida, pois possui a vantagem de formar nitratos solúveis em água durante a mineralização e causa menor interferência nas análises por métodos de espectrometria atômica, além de estar disponível comercialmente com alto grau de pureza. As principais desvantagens da digestão por via úmida incluem o longo tempo de execução, com necessidade de monitoramento constante, o uso de grandes quantidades de reagentes tóxicos e o risco de contaminação da amostra pelo ambiente (KORN *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2003; HOENIG e KERSABIEC, 1996).

A digestão por via úmida também pode ser conduzida utilizando o equipamento de micro-ondas como fonte de energia. Esse método tem sido bastante utilizado como uma forma de aumentar a eficiência da decomposição da matéria orgânica em alguns tipos de amostra, além de reduzir o tempo de digestão e a quantidade necessária de reagentes oxidantes. A digestão assistida por micro-ondas em recipientes fechados sob pressão apresenta grandes vantagens no tratamento de amostras de alimentos por ser um método rápido, com menor risco de contaminação da amostra e de perdas de elementos voláteis. Porém, a quantidade de amostra a ser digerida em cada recipiente é bastante limitada, o que dificulta a análise de traços e micro-elementos. Além disso, o aumento excessivo de pressão nesse tipo de sistema, especialmente durante a digestão de amostras com elevado conteúdo orgânico, pode levar à ruptura do recipiente. Outro fator limitante desse método é o longo tempo de resfriamento necessário para que o recipiente possa ser aberto, o que pode levar horas dependendo do tipo de equipamento utilizado (SZYMCZYCHA-MADEJA *et al.*, 2014; KORN *et al.*, 2008; LAMBLE e HILL, 1998; HOENIG e KERSABIEC, 1996).

Considerando as desvantagens relacionadas às técnicas convencionais de preparo de amostras, existe uma busca constante pelo desenvolvimento de novas metodologias para a determinação de minerais em alimentos, buscando minimizar esses problemas e produzir



resultados mais exatos e precisos. Nesse sentido, pode-se destacar a utilização de Processos Oxidativos Avançados (POAs) que representam uma alternativa mais limpa, eficiente e simples no tratamento de amostras para a determinação de minerais através de técnicas espectrométricas (ROCHA *et al.*, 2015; BRANDÃO *et al.*, 2012; BRANDÃO, 2010).

#### 3.4.1. Processos Oxidativos Avançados (POAs)

Os Processos Oxidativos Avançados foram utilizados inicialmente para o tratamento de águas e efluentes. O primeiro trabalho relacionado foi realizado em 1886 por De Meritens, que utilizou a combinação entre ozônio e radiação ultravioleta para oxidar complexos de cianeto presentes na água. Porém, somente em 1973 o termo “Tecnologias de Oxidação Avançada” passou a ser utilizado. A partir dessa época, vários trabalhos foram publicados com a utilização de diferentes combinações de agentes oxidantes para o tratamento de águas e efluentes (TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

Recentemente, os POAs estão sendo aplicados também no preparo de amostras para análise elementar e apresentam diversas vantagens quando comparados aos métodos convencionais (digestão por via seca e por via úmida). Eles possuem maior eficiência na decomposição de compostos orgânicos e necessitam de um menor volume de reagentes, o que diminui a possibilidade de contaminação da amostra e a geração de resíduos tóxicos, além de consumirem menos energia em sua execução. Dessa forma, os POAs são considerados como alternativas mais limpas para o preparo de amostras, contribuindo para a química verde (ROCHA *et al.*, 2013; BENDICHO *et al.*, 2010; CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Os POAs têm como característica comum a formação de radicais hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), que são espécies fortemente reativas, cujo potencial de oxidação (2,8 V) só é menor que o do flúor. Devido à baixa seletividade, essas espécies são capazes de oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos a água, dióxido de carbono e íons inorgânicos através de reações de degradação. Os tipos de reações que ocorrem durante o processo dependem da estrutura do composto orgânico a ser oxidado. Podem ocorrer reações de abstração de átomos de hidrogênio, adições eletrofílicas em moléculas insaturadas ou aromáticas, transferência eletrônica e reações radicalares (RIBEIRO *et al.*, 2015; GAMA, 2012; GROMBONI *et al.*, 2010; GOMES, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2007; TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

Para que a oxidação dos compostos orgânicos seja eficaz os radicais hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) devem ser formados continuamente através de reações químicas e fotoquímicas, devido à

sua grande instabilidade. Dessa forma, a formação desses radicais pode ser acelerada pelo uso de combinações de agentes oxidantes, como ozônio (O<sub>3</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), com radiação ultravioleta (UV) ou visível (Vis) e catalisadores, como íons metálicos ou semicondutores, o que caracteriza cada tipo de POA (SAEID e BEHNAJADY, 2015; GOMES, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2007). Alguns exemplos são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Exemplos de Processos Oxidativos Avançados (POAs).

<b>Processo</b>	<b>Oxidantes</b>
Ozonização	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	O <sub>3</sub> /UV
	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
Foto-Oxidação UV	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
Fenton	Fe/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Foto-Fenton	Fe/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
Fotocatálise	TiO <sub>2</sub> /UV
	TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV

(Fonte: GAMA, 2012)

Alguns trabalhos encontrados na literatura descrevem o uso de POAs no preparo de amostras de sucos de frutas para a determinação de metais. A reação de foto-Fenton acoplada à radiação de micro-ondas foi aplicada por Gromboni *et al.* (2010) no preparo de amostras de sucos para a determinação de Ba, C, Ca, K, Mg, Mn, Na e Sr por ICP-OES. Com isso, foram obtidas taxas de recuperação semelhantes às observadas com o uso da digestão por micro-ondas convencional. Brandão *et al.* (2012) descrevem o uso da Foto-Oxidação UV no preparo de amostras de sucos de frutas para a determinação de Cu, sendo que, nas condições otimizadas, os resultados não apresentaram diferenças significativas quando comparados àqueles obtidos através da digestão ácida. No presente estudo, foi utilizado o processo de Foto-Oxidação UV no preparo de amostras, o qual é descrito a seguir com mais detalhes.

#### 3.4.1.1. Foto-oxidação UV

O processo de Foto-Oxidação UV foi utilizado pela primeira vez por Armstrong *et al.* (1966) para a determinação de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) em amostras de água. Sua primeira aplicação como uma etapa de pré-tratamento de amostras para a determinação de metais foi realizada por Frimmel e Winkler (1975). Desde então, esse

processo tem sido aplicado em diversos tipos de matrizes para a determinação de metais, utilizando principalmente as técnicas de voltametria e de espectrometria de absorção atômica (BRANDÃO, 2010).

Yong *et al.* (2006) aplicaram o processo de Foto-Oxidação UV (combinação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no tratamento de amostras de sangue para a determinação de Cr por voltametria catalítico-adsortiva de redissolução (CAdSV). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por AAS após a digestão por via seca da amostra, sendo que não foram observadas diferenças significativas. Processos semelhantes foram aplicados por Santos *et al.* (2009) e Brandão *et al.* (2012) no tratamento de amostras de vinho e suco, respectivamente, para a determinação de diferentes metais (Fe, Mn e Cu) por FAAS. Em ambos os estudos o processo de Foto-Oxidação UV mostrou-se eficiente para o tratamento das amostras, produzindo resultados com precisão e exatidão adequadas.

A Foto-Oxidação UV é bastante eficiente na decomposição de compostos orgânicos. Esse processo faz uso de radiação UV associada a reagentes oxidantes, como O<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, HNO<sub>3</sub> e, principalmente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BRANDÃO, 2010; CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004). A taxa de degradação da matéria orgânica em uma amostra é diretamente proporcional à intensidade da radiação UV, ao tempo de irradiação e à temperatura da amostra (BULDINI *et al.*, 2002).

A radiação ultravioleta compreende a faixa de comprimentos de onda entre 100 e 400 nm, sendo classificada como UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) e UV-C (280-100 nm). Na região espectral UV-C a radiação apresenta energia suficiente para romper ligações químicas. Para o tratamento de amostras normalmente é utilizada radiação UV em comprimentos de onda na faixa de 190-380 nm (ROCHA *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2013).

A principal fonte de radiação UV utilizada em aplicações de laboratório e industriais é a lâmpada de vapor de mercúrio, a qual emite radiação em comprimentos de onda entre 200 e 435 nm. Sua utilização está relacionada ao baixo custo e facilidade de funcionamento, além de boa eficiência energética (proporção de potência elétrica convertida em radiação) e espectral (proporção de radiação emitida no UV) (CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003; BULDINI *et al.*, 2002). As lâmpadas de mercúrio por descarga em arco são formadas por eletrodos montados no interior de um bulbo de quartzo contendo uma quantidade do metal e um gás nobre (normalmente argônio), o qual contribui para o aumento da corrente de elétrons. A irradiação emitida é proveniente do relaxamento luminescente dos átomos de mercúrio, excitados pelas colisões resultantes da

corrente de elétrons e íons no arco formado entre os eletrodos (BRANDÃO, 2010; CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003).

As lâmpadas de vapor de mercúrio podem ser de baixa, média ou alta pressão, de acordo com a pressão dos gases no interior do bulbo, o que influencia diretamente no espectro de emissão da lâmpada. As lâmpadas de baixa pressão são monocromáticas, com emissão em  $\lambda = 253 \text{ nm}$ , e possuem maior eficiência de conversão da potência em radiação UV do que as lâmpadas de média e alta pressão. Entretanto, para compensar a baixa intensidade luminosa das lâmpadas de baixa pressão, é necessária a construção de bulbos compridos, às vezes enrolados em forma de espiral, para obter um maior fluxo luminoso total. Além disso, essas fontes operam em baixas temperaturas. As lâmpadas de média e alta pressão, por outro lado, podem alcançar temperaturas de até 600-800°C e apresentam um espectro de emissão caracterizado por linhas mais alargadas e um fundo contínuo que cobre toda a região UV. Porém, somente cerca de 30% da potência elétrica consumida é convertida em radiação UV (SHANKAR *et al.*, 2015; BRANDÃO, 2010; CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003).

Durante o processo de Foto-Oxidação UV, várias espécies intermediárias podem ser formadas: oxigênio singlete, radicais superóxido e alquilperóxido, ozônio ( $\text{O}_3$ ), radicais hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), entre outras. Dentre essas espécies, acredita-se que os radicais hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) sejam os agentes mais importantes envolvidos na oxidação da matéria orgânica, devido ao seu elevado potencial de oxidação em meio ácido (BRANDÃO, 2010; CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

O radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) é altamente reativo, sendo capaz de romper ligações de caráter covalente e, em concentração suficiente, pode levar à mineralização completa dos compostos orgânicos presentes em uma amostra. Ele pode ser gerado a partir da fotólise da água ou do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela ação da radiação UV, conforme as Equações 1 e 2 (BRANDÃO, 2010; MACHADO 2007).



Em alguns casos, apenas a radiação UV já é suficiente para a mineralização da amostra, devido à fotólise das moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ . Porém, para amostras mais complexas e com concentrações elevadas de compostos orgânicos, torna-se necessária a combinação

com reagentes oxidantes, tornando o processo mais rápido e eficiente (MACHADO, 2007; BULDINI *et al.*, 2002).

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é o reagente oxidante mais utilizado no processo de Foto-Oxidação UV por ser um oxidante químico eficiente e de fácil manipulação (BRITTO e RANGEL, 2008). A estabilidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varia de acordo com o pH e a temperatura. Em altas temperaturas e em meio alcalino há o favorecimento de sua decomposição (MACHADO, 2007). Além disso, é importante determinar a concentração adequada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ser utilizada em uma reação de Foto-Oxidação UV, pois o excesso desse reagente em presença de altas concentrações de radicais hidroxila (HO<sup>•</sup>) favorece reações competitivas com a formação de espécies menos reativas. Essas reações produzem um efeito inibitório sobre a degradação dos compostos orgânicos, conforme as Equações 3 a 6 (TAMBOSI, 2005).



A concentração de reagentes, o tempo de radiação UV e o pH são os principais fatores que influenciam na eficiência do processo de Foto-Oxidação UV e devem ser otimizados para cada tipo de amostra. Outras variáveis importantes incluem a intensidade da radiação UV, distância da fonte de radiação com relação às amostras e a temperatura (YANG *et al.*, 2014; BRANDÃO, 2010; CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

O uso do processo de Foto-Oxidação UV no tratamento de amostras apresenta como vantagens a utilização de reagentes menos tóxicos, em pequenas quantidades, menor risco de contaminação, além da possibilidade de ser conduzida a baixas temperaturas, evitando perdas por volatilização, e em níveis de pH fracamente ácidos ou alcalinos (BRANDÃO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2009).

### 3.5. Aspectos gerais sobre validação de métodos analíticos

Para que um novo método de análise seja implantado em laboratórios de controle de qualidade, é necessário, primeiramente, avaliar se ele é adequado ao seu propósito e se produz resultados confiáveis. Nesse sentido, a validação de métodos analíticos é de grande importância para assegurar sua aplicabilidade e alcance durante as operações de rotina de

um laboratório. A validação deve ser considerada quando se desenvolve um novo método e também quando são efetuadas adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (RIBEIRO e FERREIRA, 2008; BRITO *et al.*, 2003).

No Brasil, a validação de métodos analíticos é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). O INMETRO define validação como a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (BRASIL, 2011). Segundo a ANVISA, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

A validação de métodos é um requisito importante na prática da análise química, pois um método não confiável possui pouco valor e pode por em risco toda a análise e seus resultados (EURACHEM, 1998). Os estudos de validação devem ser representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI *et al.*, 2004). Figuras de mérito como seletividade, ajuste da curva analítica e determinação de sua faixa linear, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez são indicadores quantitativos do bom desempenho de um método analítico. Porém, os parâmetros considerados podem variar de acordo com a técnica analítica empregada ou com o protocolo de validação a ser seguido e devem ser baseados na intenção de uso do método (RIBEIRO e FERREIRA, 2008; RIBANI *et al.*, 2004). Os parâmetros utilizados neste trabalho são descritos a seguir.

### 3.5.1. Curva analítica e Linearidade

A relação matemática entre o sinal medido e a concentração do analito é expressa pela curva analítica, a qual deve conter no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva, devido aos possíveis erros associados (FERREIRA, 2016; RIBANI *et al.*, 2004).

A curva analítica pode ser obtida de diferentes formas: padronização externa, padronização interna, simulação de matriz ou adição de padrão. A escolha do método de padronização vai depender do tipo de amostra e da presença ou não de interferências da matriz nas medidas (FERREIRA, 2016; ANDRADE *et al.*, 2014).

O método de padronização externa compara o sinal do analito de interesse com o sinal de soluções aquosas contendo concentrações conhecidas do elemento e preparadas a partir de uma solução padrão. No método de padronização interna, é adicionada às soluções padrões do analito uma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. Na padronização por simulação de matriz, as soluções padrão são preparadas em matriz similar à da amostra para simular os efeitos da matriz ou de possíveis interferentes. Por fim, o método de adição de padrão consiste na adição de quantidades conhecidas do analito à própria amostra para a obtenção das soluções padrão da curva analítica, o que elimina possíveis efeitos causados pela matriz da amostra (FERREIRA, 2016; RIBANI *et al.*, 2004).

Entre os métodos citados para a obtenção da curva analítica, a padronização externa é mais vantajosa devido à rapidez, facilidade, menor custo e menor gasto de reagentes (ANDRADE *et al.*, 2014). Porém, esse método é sensível a erros de preparo de amostras e de padrões e só pode ser utilizado quando não houver interferências da matriz no sinal obtido (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Ela deve ser determinada pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes, estabelecidas de acordo com o nível de concentração esperado do analito nas amostras a serem analisadas (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003). Além disso, recomenda-se normalmente a realização de duas ou três replicatas no mesmo dia para os ensaios de linearidade (STOCKL *et al.*, 2009).

Para verificar a linearidade do método, deve ser aplicada uma regressão linear aos dados obtidos para a curva de calibração. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é o parâmetro frequentemente utilizado para estabelecer se o modelo linear é adequado e deve apresentar valores próximos de 1,0, indicando menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados (BRASIL, 2011; RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003). A ANVISA recomenda valores de coeficiente de correlação iguais ou superiores a 0,99 como critério mínimo aceitável (BRASIL, 2003).

Por outro lado, a estimativa do coeficiente de correlação linear não é suficiente para estabelecer se um método é linear, pois seu valor é influenciado pelo intervalo dos dados e o respectivo desvio padrão (ARAÚJO, 2009; STOCKL *et al.*, 2009). Dessa forma, a linearidade pode ser testada pela análise do gráfico de resíduos obtido pela regressão linear, sendo que qualquer tendência ou homogeneidade das variâncias indica que o

modelo linear não é adequado para o ajuste dos dados (THOMPSON *et al.*, 2002). A partir da análise de variância (ANOVA) e de um teste- $F$  adequado pode-se verificar se a regressão linear é significativa, onde um valor de  $F_{calculado} > F_{crítico}$  indica que existe uma relação linear entre as variáveis e que o coeficiente angular da reta de regressão não é nulo (CARDOSO *et al.*, 2010). A linearidade também pode ser avaliada pela aplicação de um teste- $F$  de falta de ajuste, comparando-se as variâncias da falta de ajuste e do erro puro, em que um valor de  $F_{calculado} < F_{crítico}$  indica que o modelo linear é adequado (CARDOSO *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2002).

### 3.5.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) é de grande importância para a análise de elementos traço ou em baixos níveis de concentração. Porém, quando se trata da determinação de espécies em concentrações muito maiores que o LQ, torna-se desnecessário determinar esses parâmetros (NATA, 2012).

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas. Esses parâmetros podem ser calculados através do método visual, método de relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 2003). A escolha do método deve levar em consideração a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária (RIBEIRO e FERREIRA, 2008).

O método baseado em parâmetros da curva analítica é o mais confiável estatisticamente e o mais utilizado quando se trata de técnicas de AAS. Nesse método, os valores de LD e LQ são determinados em termos do desvio padrão de medidas do branco analítico, o qual é constituído de todos os reagentes utilizados, com exceção da amostra e do analito (RIBANI *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2003). Os valores de LD e LQ podem ser calculados a partir das Equações 7 e 8, respectivamente.

$$LD = \frac{3s_B}{b} \quad (\text{Equação 7})$$

$$LQ = \frac{10s_B}{b} \quad (\text{Equação 8})$$



em que  $s_B$  é o desvio padrão das medidas do branco e  $b$  é o coeficiente angular da curva analítica (NATA, 2012).

### 3.5.3. Precisão

A precisão de um método analítico é a medida da dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio e está relacionada com a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. Ela é expressa, normalmente, em termos de desvio padrão relativo (DPR), também chamado de coeficiente de variação (CV), o qual pode ser calculado através da Equação 9 (RIBEIRO e FERREIRA, 2008; BRITO *et al.*, 2003).

$$\text{DPR (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

em que  $s$  é o desvio padrão e  $\bar{x}$  é o valor médio do número total de medidas.

Os limites aceitáveis para os valores de desvio padrão relativo (DPR) variam de acordo com o nível de concentração do analito na amostra analisada. A Tabela 4 traz os limites estabelecidos pela AOAC (2012).

**Tabela 4.** Valores de desvio padrão relativo (DPR) esperados em função do nível de concentração do analito.

Proporção do analito	Unidade	DPR (%)
1	100%	1,3
$10^{-1}$	10%	1,9
$10^{-2}$	1%	2,7
$10^{-3}$	0,1%	3,7
$10^{-4}$	100 ppm (mg/kg)	5,3
$10^{-5}$	10 ppm (mg/kg)	7,3
$10^{-6}$	1ppm (mg/kg)	11
$10^{-7}$	100 ppb ( $\mu$ g/kg)	15
$10^{-8}$	10 ppb ( $\mu$ g/kg)	21
$10^{-9}$	1ppb ( $\mu$ g/kg)	30

(Fonte: AOAC, 2012)

A precisão pode ser estimada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade expressa a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista, mesmo equipamento e no

mesmo local (BRASIL, 2011; BRASIL, 2003). Para a análise de repetitividade, a ANVISA recomenda um mínimo de nove determinações contemplando o intervalo linear do método (ex: três réplicas em três níveis de concentração do analito) (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003). A precisão intermediária representa a concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, porém em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. De acordo com a ANVISA, recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes para a estimativa da precisão intermediária (BRASIL, 2003). A reprodutibilidade indica a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes e é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho de seus métodos por meio de comparação interlaboratorial. É aplicada principalmente quando se deseja padronizar uma metodologia analítica (BRASIL, 2011; BRASIL, 2003).

A precisão intermediária e a reprodutibilidade podem ser expressas também em termos de valor de Horrat, utilizado principalmente na área de alimentos. Para o cálculo desse parâmetro é utilizada a estimativa de desvio padrão relativo obtido pela ANOVA, de acordo com a Equação 10 (AOAC, 2012).

$$\text{Horrat} = \frac{DPR_{\text{laboratório}}}{DPR_{\text{Horwitz}}} \quad (\text{Equação 10})$$

em que  $DPR_{\text{laboratório}}$  é o desvio padrão relativo relacionado à precisão intermediária ou reprodutibilidade obtido pela ANOVA ( $DPR_{\text{PI}}$  ou  $DPR_{\text{R}}$ , respectivamente) e  $DPR_{\text{Horwitz}}$  é o desvio padrão relativo previsto calculado pela fórmula de Horwitz, de acordo com a Equação 11 (AOAC, 2012).

$$DPR_{\text{Horwitz}} = 2C^{-0,15} \quad (\text{Equação 11})$$

em que C é a concentração do analito expressa como a fração de massa decimal. Para ser considerado aceitável, o valor de Horrat deve ser inferior a 1,3 em estudos de validação intralaboratorial (AOAC, 2012).

Outra forma de avaliar a precisão é pela comparação com um método de referência validado. Para isso, utiliza-se um teste-*F* de comparação entre variâncias e o cálculo do intervalo de confiança para a razão entre variâncias (BRASIL, 2011; CANO *et al.*, 2007).

#### 3.5.4. Exatidão

A exatidão de um método indica a proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado verdadeiro e está relacionada com o erro absoluto de uma medida. Esse parâmetro pode ser estimado de três formas distintas: pela análise de material de referência certificado (MRC), pela comparação com um método de referência ou através de ensaios de recuperação (NATA, 2012; RIBEIRO e FERREIRA, 2008; THOMPSON *et al.*, 2002).

Os MRC são materiais de referência acompanhados de um certificado com o valor de concentração de uma determinada substância e uma incerteza associada e devem ser fornecidos por órgãos conhecidos e confiáveis. Para avaliar a exatidão por meio de MRC, este deve ser analisado por meio do método a ser validado e os resultados obtidos (média e desvio padrão) devem ser comparados com os valores certificados (BRASIL, 2011; RIBANI *et al.*, 2004). Os MRC são os materiais de controle preferidos para a análise de exatidão de um método, pois estão relacionados com padrões internacionais. Porém, seu uso é restringido pelo alto custo e abrangência limitada de matrizes e analitos (BRITO *et al.*, 2003; THOMPSON *et al.*, 2002).

Quando não há disponibilidade de MRC, a exatidão pode ser avaliada por meio da comparação entre o método proposto e um método adotado como referência, avaliando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Para isso, são efetuadas análises em replicatas com os dois métodos, utilizando as mesmas amostras, em uma determinada faixa de concentração em que o método precisa ser validado. Para que o método proposto seja considerado exato, os resultados obtidos não devem apresentar diferenças significativas com relação ao método de referência (RIBANI *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2003).

Ensaio de recuperação também podem ser utilizados para estimar a exatidão de um método de análise, pois refletem a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO *et al.*, 2003). A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo e em diferentes níveis de fortificação (BRASIL, 2011). A taxa de recuperação é calculada de acordo com a Equação 12.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

em que  $C_1$  é a concentração do analito na amostra fortificada,  $C_2$  é a concentração do analito na amostra não fortificada e  $C_3$  é a concentração do analito adicionada à amostra fortificada (BRASIL, 2011). Os valores aceitáveis de recuperação podem variar de acordo com a faixa de concentração do analito nas amostras, conforme apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Valores de recuperação esperados em função da concentração do analito.

<b>Proporção do analito</b>	<b>Unidade</b>	<b>Recuperação Média (%)</b>
1	100%	98-102
$10^{-1}$	10%	98-102
$10^{-2}$	1%	97-103
$10^{-3}$	0,1%	95-105
$10^{-4}$	100 ppm (mg/kg)	90-107
$10^{-5}$	10 ppm (mg/kg)	80-110
$10^{-6}$	1ppm (mg/kg)	80-110
$10^{-7}$	100 ppb ( $\mu$ g/kg)	80-110
$10^{-8}$	10 ppb ( $\mu$ g/kg)	60-115
$10^{-9}$	1ppb ( $\mu$ g/kg)	40-120

(Fonte: AOAC, 2012)

O método baseado em ensaios de recuperação é o menos indicado para a estimativa de exatidão, pois o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que o elemento presente na amostra. Sendo assim, a presença de analitos em uma forma mais facilmente detectável pode superestimar as taxas de recuperação (BRASIL, 2011).

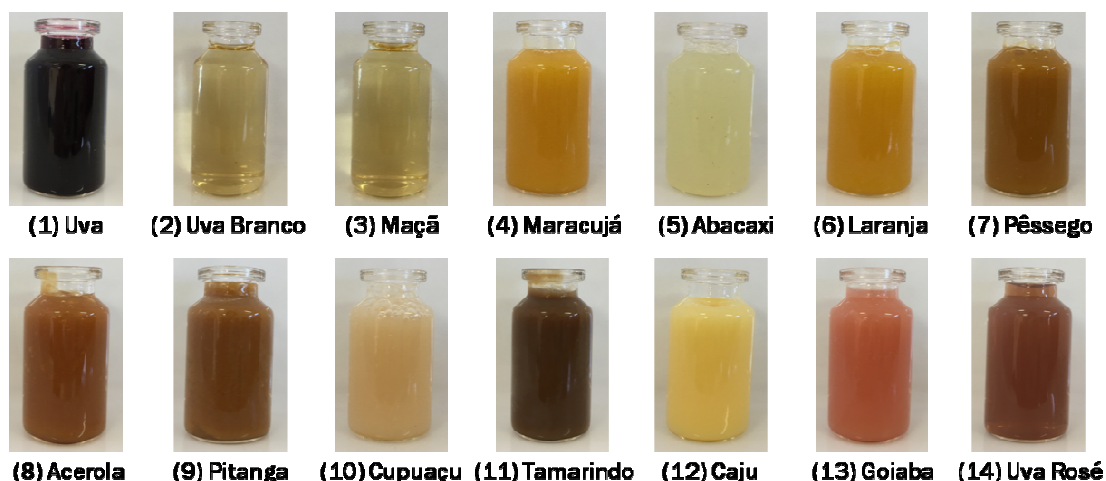
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Amostragem

Para a aplicação da metodologia analítica otimizada e validada, foram adquiridas 13 amostras de sucos de fruta de diferentes sabores e fabricantes disponíveis em estabelecimentos comerciais da cidade de Guarapuava-PR e uma amostra de suco integral de fabricação artesanal (Amostra 14) proveniente da cidade de Herval d'Oeste-SC. Essas amostras foram armazenadas nas embalagens de origem e mantidas sob refrigeração (6 a 8°C) até a realização das análises. Cada amostra foi identificada por um número, conforme apresentado na Tabela 6 e na Figura 4.

**Tabela 6.** Identificação das amostras de sucos de fruta.

<b>Identificação</b>	<b>Sabor</b>	<b>Tipo</b>
1	Uva	Suco Integral
2	Uva Branco	Suco Integral
3	Maçã	Suco Integral
4	Maracujá	Suco Concentrado
5	Abacaxi	Suco Integral
6	Laranja	Suco Integral
7	Pêssego	Suco Concentrado
8	Acerola	Suco Tropical
9	Pitanga	Suco Tropical
10	Cupuaçu	Suco Tropical
11	Tamarindo	Suco Tropical
12	Caju	Suco Concentrado
13	Goiaba	Suco Concentrado
14	Uva Rosé	Suco Integral/Artesanal



**Figura 4.** Amostras de sucos de fruta de diferentes sabores e fabricantes (Fonte: Arquivo pessoal).

## 4.2. Materiais e Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau analítico em todos os procedimentos realizados. Para o preparo de soluções foi utilizada água deionizada obtida através do sistema de osmose reversa OS10 LX. Ácido nítrico 65% (m/v) (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio 35% (m/v) (Biotec) foram utilizados no preparo das amostras. As soluções tampão utilizadas na otimização do processo de Foto-Oxidação UV foram preparadas com: acetato de sódio anidro (Química Moderna) e ácido clorídrico 37% (FMaia) para pH 5,0; fosfato de sódio monobásico anidro (Synth) e hidróxido de sódio (Synth) para pH 8,0; cloreto de amônio (Química Moderna) e hidróxido de amônio 30% (Vetec) para pH 10,0. As soluções padrão de Fe, Mn e Zn foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol).

Todas as vidrarias utilizadas foram mantidas previamente em solução de ácido nítrico (5%, v/v) por no mínimo 24 horas e em seguida lavadas com água deionizada para evitar possíveis contaminações durante as análises.

## 4.3. Instrumentação

No preparo das amostras foram utilizados equipamentos como chapa de aquecimento (Novatecnica), balança analítica (Shimadzu, modelo AUW220D) com precisão de  $\pm 0,0001$  g, sistemas de micropipetas (Labmate-HTL) com diferentes capacidades, medidor de pH (HANNA, modelo pH 21 pH/mVmeter) equipado com um eletrodo de vidro combinado de Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>, e digestor UV de laboratório

(Figura 5) equipado com uma lâmpada de vapor de mercúrio (250 W) posicionada cerca de 10 cm acima do suporte das amostras.



**Figura 5.** Digestor UV utilizado no preparo das amostras por Foto-Oxidação UV (Fonte: Arquivo pessoal).

Para obtenção dos espectros de varredura das amostras entre 200 e 800 nm foi utilizado um espectrofotômetro de feixe simples Varian, modelo UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Bio e os ensaios do planejamento fatorial foram realizados com um espectrofotômetro de feixe simples Spectrum Meter, modelo SP-2000 UV. Cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm foram utilizadas em ambos os casos.

As determinações de Fe, Mn e Zn foram realizadas através de um Espectrofotômetro de Absorção Atômica em Chama da Varian, modelo AA-220 (Figura 6), equipado com lâmpadas de catodo oco. Para a atomização foi utilizada chama composta de ar/acetileno. Além disso, foram empregadas as condições operacionais recomendadas pelo fabricante do equipamento (Tabela 7).

**Tabela 7.** Parâmetros instrumentais para a determinação de Fe, Mn e Zn em amostras de sucos de fruta por FAAS.

Parâmetro	Fe	Mn	Zn
Corrente da lâmpada (mA)	5,0	5,0	5,0
Comprimento de onda (nm)	248,3	279,5	213,9
Largura da fenda espectral (nm)	0,2	0,2	1,0
Fluxo de acetileno (L min <sup>-1</sup> )	2,00	2,00	2,00
Fluxo de ar (L min <sup>-1</sup> )	11,00	11,00	11,00



**Figura 6.** Espectrofotômetro de Absorção Atômica em Chama (Fonte: Arquivo pessoal).

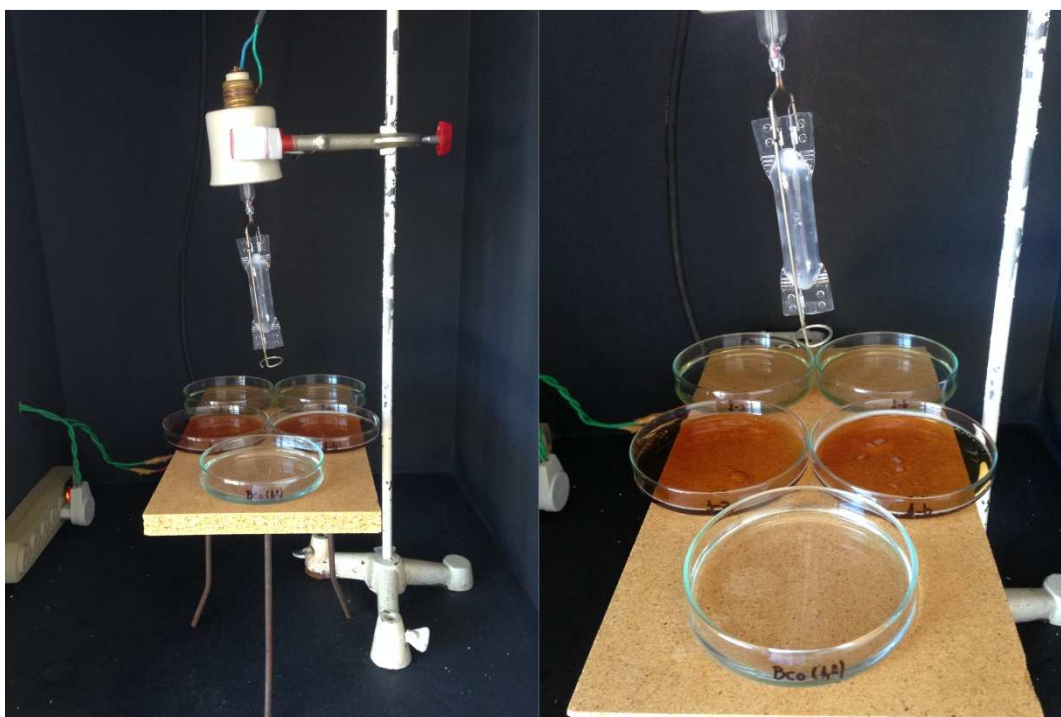
#### 4.4. Preparo das amostras de suco de fruta

Para a determinação de minerais essenciais em sucos de fruta foi empregado o processo de Foto-Oxidação UV no preparo de amostra, cujo procedimento é descrito a seguir (item 4.4.1). Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada amostra e juntamente foram preparadas soluções de controle analítico (brancos) contendo todos os reagentes utilizados no preparo da amostra com exceção dos analitos de interesse. As condições experimentais para o processo de Foto-Oxidação UV foram avaliadas por meio de um planejamento fatorial 2<sup>4</sup> (item 4.4.2) para verificar a influência de parâmetros como o volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o pH, a concentração da solução tampão e o tempo de irradiação UV.



#### 4.4.1. Procedimento de preparo de amostra pelo processo de Foto-Oxidação UV

Primeiramente, pesou-se cerca de 10,0 g de amostra em uma placa de Petri e então foram adicionados 6,25 mL de solução tampão  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 10,0) e 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% (m/v). A solução foi submetida à irradiação UV por 120 minutos, conforme apresentado na Figura 7. Em seguida, a solução resultante foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água deionizada.



**Figura 7.** Soluções das amostras de suco de fruta no digestor UV (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.4.2. Avaliação dos efeitos de parâmetros experimentais sobre o processo de Foto-Oxidação UV

Para a aplicação do planejamento fatorial  $2^4$  foi utilizada a amostra 1 (suco de uva), sendo que a massa de amostra foi fixada em 10,00 g para cada ensaio. Para o ajuste do pH foram utilizadas soluções tampão com concentração inicial de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ : solução tampão de acetato para pH 5,0; solução tampão de fosfato para pH 8,0; e solução tampão de amônio/cloreto de amônio para pH 10,0 (BRANDÃO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2009).

Os fatores avaliados foram: volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH da solução, concentração da solução tampão e tempo de irradiação UV. Como resposta foi avaliada a absorbância da solução final da amostra a 280 nm, que corresponde a um dos comprimentos de onda de

absorbância máxima ( $\lambda_{\max}$ ) da amostra 1 (suco de uva), obtido pelo espectro de varredura UV/Visível (de 200 a 800 nm). Também foram realizados três ensaios no ponto central para estimar o erro nas medidas. Os fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial  $2^4$ .

Fatores	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35% (m/v) (mL)	0,5	1,5	2,5
pH	5,0	8,0	10,0
Concentração da solução tampão (mol L <sup>-1</sup> )	0,05	0,15	0,25
Tempo de irradiação UV (min)	15	60	90

Os efeitos do planejamento fatorial foram calculados pela Equação 13:

$$Ef = (R+) - (R-) \quad (\text{Equação 13})$$

em que  $\bar{R}^+$  e  $\bar{R}^-$  são as diferenças das médias dos níveis (+) e (-), respectivamente, dos fatores envolvidos.

Os efeitos das variáveis na absorbância da amostra de suco de uva foram testados para a significância estatística no nível de 95% de confiança pelo cálculo do erro padrão e pelo gráfico de Pareto. Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software *Minitab* for Windows versão 16.2.2 (MINITAB, 2010).

#### 4.4.3. Método de referência (digestão por via úmida)

Para avaliar a precisão e exatidão do processo de Foto-Oxidação UV foi utilizada a digestão por via úmida como método de referência, cujo procedimento foi adaptado de SZYMCZYCHA-MADEJA e WELNA (2013). Primeiramente, pesou-se cerca de 10,0 g de amostra de suco de fruta em um béquer de 250 mL e adicionou-se 6,0 mL de HNO<sub>3</sub> 65% (m/v). A solução foi coberta com vidro relógio e aquecida em chapa elétrica com banho de areia a uma temperatura de 80-85°C durante aproximadamente 3 horas. A mistura foi resfriada e em seguida foram adicionados 4,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (m/v) e aquecida novamente até obter uma solução incolor, a qual foi deixada evaporar até quase a secura. A solução restante foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água deionizada.

#### 4.5. Validação do método de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra

A validação da metodologia analítica desenvolvida para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS foi realizada de acordo com guias orientativos da AOAC, Anvisa, INMETRO, NATA, IUPAC, EURACHEM e artigos da literatura (ANDRADE *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2010; ARAÚJO, 2009; STOCKL *et al.*, 2009; RIBEIRO e FERREIRA, 2008; CANO *et al.*, 2007; ROZET *et al.*, 2007; RIBANI *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2003). Dessa forma, foram avaliados parâmetros como linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão. A análise estatística dos dados foi feita através do software estatístico *Minitab* for Windows versão 16.2.2 (MINITAB, 2010).

##### 4.5.1. Curvas analíticas e linearidade

Para investigar a presença de possíveis interferências da matriz da amostra, as curvas analíticas foram obtidas de duas formas diferentes: calibração por padrão externo (PE), com a diluição de solução padrão do elemento em solução aquosa; e calibração por adição de padrão (AP), com adição do elemento à matriz da amostra de suco de fruta antes de ser submetida ao processo de Foto-Oxidação UV, conforme o procedimento descrito no item 4.4.1 (FERREIRA, 2016; ANDRADE *et al.*, 2014). Nesse procedimento foram utilizadas as amostras 1 (suco de uva) e 3 (suco de maçã).

As curvas de calibração foram construídas em diferentes faixas de concentração para cada elemento, considerando a faixa linear de trabalho (Tabela 9). Para a determinação de Fe e Mn foram utilizadas duas faixas de concentração diferentes devido à grande variação da concentração desses elementos nas diferentes amostras analisadas.

**Tabela 9.** Faixas de concentração utilizadas para as curvas de calibração na determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS

<b>Metal</b>	<b>Faixa de concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Fe</b>	0,1 – 0,5
	0,5 – 2,5
<b>Mn</b>	0,1 – 0,5
	0,4 – 2,0
<b>Zn</b>	0,1 – 0,5

A linearidade das curvas analíticas foi verificada pela aplicação de regressão linear e de teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança. Para isso, cada ponto da curva foi analisado em duplicata (ARAÚJO, 2009; ROZET *et al.*, 2007).

#### 4.5.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ foram obtidos pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, utilizando-se para isso a curva por padrão externo. Para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação foram realizadas 10 medidas consecutivas do controle analítico (branco) e então foram aplicadas as Equações 7 e 8 do item 3.5.2 (NATA, 2012; RIBANI *et al.*, 2004).

#### 4.5.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da aplicação de um teste-*F* de comparação de variâncias no nível de 95% de confiança. Para isso foram utilizadas as variâncias ponderadas dos resultados obtidos com o método de Foto-Oxidação UV e o método de referência (digestão por via úmida).

Além disso, foi avaliada a precisão por meio da análise de repetitividade e precisão intermediária pelo cálculo dos respectivos desvios padrão relativos (DPR). Para os testes de repetitividade foram preparadas cinco réplicas verdadeiras das amostras 11 e 13 (de maior e menor nível de concentração dos elementos, respectivamente) utilizando o procedimento descrito no item 4.4.1, as quais foram analisadas por FAAS no mesmo dia. No teste de precisão intermediária, as amostras de suco de fruta foram preparadas da mesma forma que para os testes de repetitividade e analisadas por FAAS durante três dias consecutivos. Os desvios padrão relativos (DPR) relacionados à repetitividade e à precisão intermediária foram calculados por meio da Equação 9 do item 3.5.3. A precisão intermediária também foi expressa em termos de valor de Horrat, calculado de acordo com a Equação 10 apresentada no mesmo item.

#### 4.5.4. Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada por meio de uma comparação entre os resultados obtidos utilizando-se a Foto-Oxidação UV e o método de referência (digestão por via úmida). Para isso foram consideradas todas as amostras analisadas, aplicando-se

aos resultados um teste-*t* pareado e a análise por regressão linear no nível de 95% de confiança (THOMPSON *et al.*, 2002).

Também foi avaliada a exatidão do método por meio de ensaios de recuperação em dois níveis de fortificação para cada elemento. Para isso foi utilizada a amostra 1 (suco de uva), na qual foram adicionadas concentrações conhecidas dos elementos de interesse: 0,3 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> para Fe; 0,3 e 1,2 mg L<sup>-1</sup> para Mn; 0,1 e 0,3 mg L<sup>-1</sup> para Zn. Em seguida a amostra foi preparada de acordo com o procedimento descrito no item 4.4.1 e então foi submetida à determinação dos elementos por FAAS. Esses ensaios foram realizados em duplicata. As porcentagens de recuperação foram calculadas de acordo com a Equação 12 do item 3.5.4 (BRASIL, 2011).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Avaliação dos efeitos de parâmetros experimentais sobre o processo de Foto-Oxidação UV utilizado no preparo de amostra de suco de fruta**

Para avaliar as condições experimentais do preparo das amostras de suco de fruta por Foto-Oxidação UV optou-se pela aplicação de análise multivariada. Essa técnica possui como principais vantagens a redução do número de experimentos, tornando a análise mais rápida, econômica e efetiva, e a possibilidade de avaliar a influência de vários fatores simultaneamente, além das interações entre eles (JALBANI *et al.*, 2006). Com a aplicação do planejamento fatorial  $2^4$  foi possível avaliar a influência de alguns dos principais fatores envolvidos sobre a degradação da matéria orgânica, considerando que a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) exige digestão da amostra, com eliminação total ou parcial da matéria orgânica.

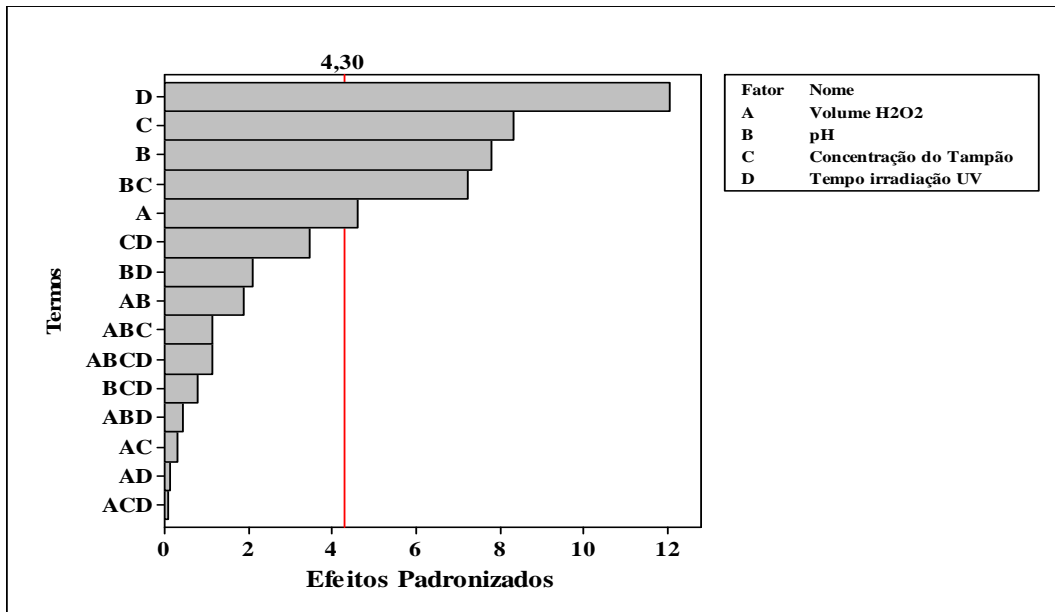
A amostra 1 (suco de uva) foi selecionada para a realização dos ensaios, sendo que a massa foi fixada em 10,0 g. O planejamento fatorial  $2^4$  incluiu como fatores o volume de  $H_2O_2$  35% (m/v) em mL, o pH da solução, a concentração da solução tampão em  $mol\ L^{-1}$  e o tempo de irradiação UV em minutos. A variação desses quatro fatores em dois níveis resultou em 16 ensaios com diferentes condições experimentais, além de mais três ensaios no ponto central que foram realizados para estimar o erro experimental. Como resposta foi avaliada a degradação da matéria orgânica na amostra medindo-se a absorbância da solução resultante a 280 nm, correspondente a um dos comprimentos de onda de absorbância máxima do suco de uva. A matriz e os resultados do planejamento fatorial são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Matriz do planejamento fatorial  $2^4$  aplicado na avaliação das condições experimentais do preparo de amostra de suco de uva (amostra 1) por Foto-Oxidação UV.

Ensaio	Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35% (m/v) (mL)	pH	Concentração do Tampão (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de irradiação UV (min)	Absorbância ( $\lambda = 280$ nm)
1	(-) 0,5	(-) 5	(-) 0,05	(-) 15	1,503
2	(+) 2,5	(-) 5	(-) 0,05	(-) 15	1,309
3	(-) 0,5	(+) 10	(-) 0,05	(-) 15	1,389
4	(+) 2,5	(+) 10	(-) 0,05	(-) 15	1,293
5	(-) 0,5	(-) 5	(+) 0,25	(-) 15	1,381
6	(+) 2,5	(-) 5	(+) 0,25	(-) 15	1,172
7	(-) 0,5	(+) 10	(+) 0,25	(-) 15	0,719
8	(+) 2,5	(+) 10	(+) 0,25	(-) 15	0,610
9	(-) 0,5	(-) 5	(-) 0,05	(+) 90	0,908
10	(+) 2,5	(-) 5	(-) 0,05	(+) 90	0,757
11	(-) 0,5	(+) 10	(-) 0,05	(+) 90	0,930
12	(+) 2,5	(+) 10	(-) 0,05	(+) 90	0,784
13	(-) 0,5	(-) 5	(+) 0,25	(+) 90	1,050
14	(+) 2,5	(-) 5	(+) 0,25	(+) 90	0,720
15	(-) 0,5	(+) 10	(+) 0,25	(+) 90	0,481
<b>16</b>	<b>(+) 2,5</b>	<b>(+) 10</b>	<b>(+) 0,25</b>	<b>(+) 90</b>	<b>0,464</b>
17	(0) 1,5	(0) 8	(0) 0,15	(0) 60	0,995
18	(0) 1,5	(0) 8	(0) 0,15	(0) 60	0,897
19	(0) 1,5	(0) 8	(0) 0,15	(0) 60	0,864

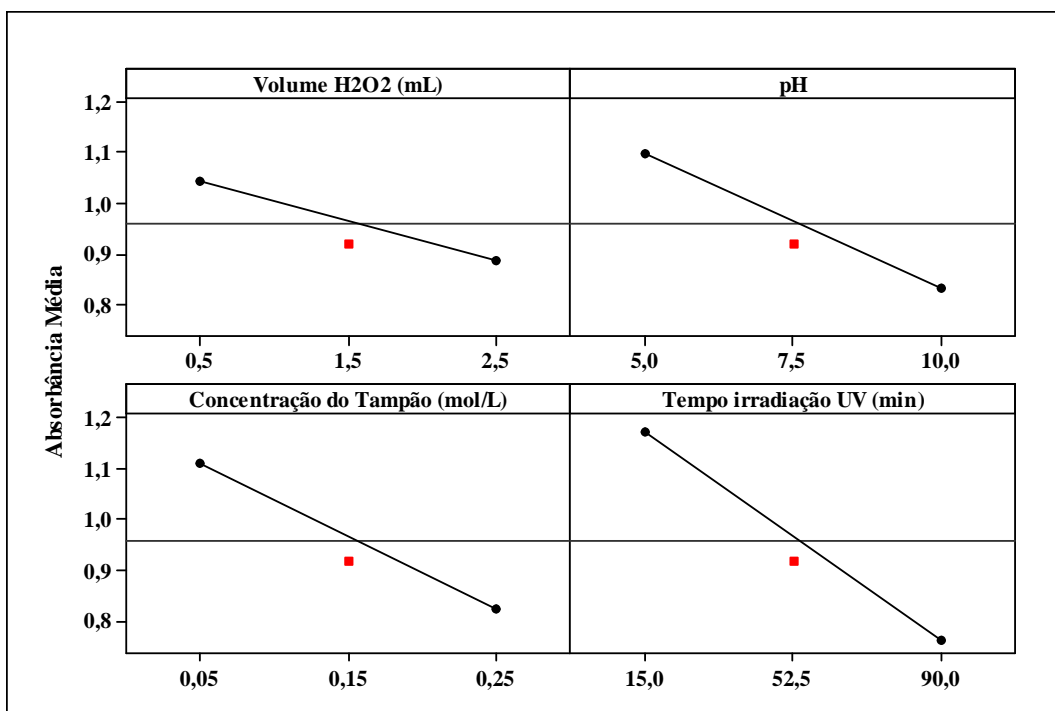
Considerando a análise do planejamento fatorial  $2^4$ , o ensaio 16 foi o que resultou no menor valor de absorbância a 280 nm (0,464), mostrando ser a melhor condição para o preparo de amostra de suco de fruta por Foto-Oxidação UV.

Analisando-se o gráfico de Pareto (Figura 8) pode-se perceber que todas as variáveis envolvidas no planejamento fatorial (volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH, concentração da solução tampão e tempo de irradiação UV) possuem efeitos significativos sobre a resposta no nível de 95% de confiança. Além disso, o efeito de interação entre a concentração da solução tampão e o pH também é significativo.



**Figura 8.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do Planejamento Fatorial  $2^4$ .

Na Figura 9 é possível verificar a influência dos fatores avaliados no planejamento sobre a degradação da matéria orgânica, representada pela diminuição da absorbância a 280 nm. Uma redução maior da absorbância indica maior eficiência do processo de Foto-Oxidação UV na digestão da amostra.



**Figura 9.** Diagrama dos efeitos principais do Planejamento Fatorial  $2^4$ .



A presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combinada à radiação UV aumenta a degradação da matéria orgânica devido à formação de radicais hidroxila (HO·). Esta espécie oxidante altamente reativa pode ser formada a partir da fotólise do peróxido de hidrogênio, conforme a Equação 14 (BORGHEI e HOSSEINI, 2008).



Pode-se observar na Figura 9 que o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> torna o processo mais eficiente, já que aumenta a produção de radicais hidroxila (HO·) e, conseqüentemente, a oxidação da matéria orgânica.

Com relação ao pH, sabe-se que a reatividade do peróxido de hidrogênio e a capacidade de geração de radicais hidroxila (HO·) no processo de Foto-Oxidação UV dependem diretamente desta variável (BORGHEI e HOSSEINI, 2008). Em geral, o pH ácido é mais favorável em reações de Foto-Oxidação UV, pois em meio alcalino ocorre a formação de radicais hidroperoxila (HO<sub>2</sub>·), que são menos reativos que os radicais hidroxila. Além disso, essa espécie pode reagir com os radicais hidroxila (HO·) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual, diminuindo a concentração dessas espécies e, conseqüentemente, reduzindo a velocidade das reações de oxidação da matéria orgânica (MURUGANANDHAM E SWAMINATHAN, 2004; LEGRINI *et al.*, 1993). Porém, no presente estudo foi observada maior redução na absorbância em meio alcalino (pH 10,0). Esse resultado deve-se possivelmente à grande quantidade de compostos fenólicos presentes nos sucos de fruta (REKHA *et al.*, 2012; RIZZON E LINK, 2006). A alcalinidade do meio favorece a oxidação desses compostos devido ao aumento da concentração de íons fenolato, os quais são mais reativos que os fenóis (BRITTO E RANGEL, 2008). Brandão *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2009) encontraram resultados similares para a análise de amostras de sucos de fruta e de vinho, respectivamente, utilizando a Foto-Oxidação UV em pH alcalino.

Para garantir o controle do pH do meio foi utilizada solução tampão, cuja concentração interfere significativamente no processo de Foto-Oxidação UV. O excesso de solução tampão pode interferir no processo, produzindo reações indesejáveis, o que diminui a eficiência na digestão da amostra. Por outro lado, uma concentração muito baixa da solução tampão pode ser insuficiente para tamponar o meio. Foi observado que o aumento da concentração da solução tampão de 0,05 para 0,25 mol L<sup>-1</sup> aumenta a eficiência do processo, pois assegura que o processo de Foto-Oxidação UV seja realizado em pH mais adequado para a degradação da matéria orgânica na amostra de suco de uva.

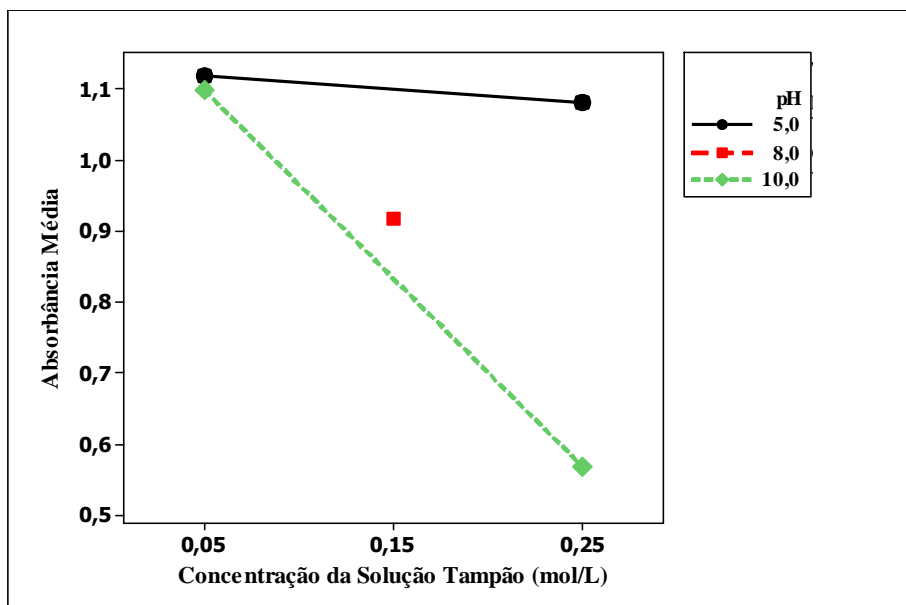
O tempo de irradiação UV também exerce uma importante influência na eficiência do método, já que a irradiação UV promove a formação de radicais hidroxila (HO $\cdot$ ) a partir do peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$ ) (BORGHEI e HOSSEINI, 2008; MURUGANANDHAM E SWAMINATHAN, 2004). Sendo assim, um tempo maior de irradiação UV aumenta a formação de radicais hidroxila (HO $\cdot$ ) e proporciona uma taxa maior de degradação da matéria orgânica. Nesse estudo foi observada uma diminuição bastante significativa na absorbância quando o tempo foi aumentado de 15 para 90 minutos. Porém, para verificar se esse tempo de irradiação UV era suficiente para a digestão da amostra de suco de fruta, foi realizado um estudo do processo de Foto-Oxidação UV variando o tempo em intervalos de 15 minutos. Como respostas foram avaliados os teores de Fe, Mn e Zn determinados por FAAS, buscando-se a máxima liberação desses elementos na solução da amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Resultados do estudo do tempo de irradiação UV no processo de Foto-Oxidação UV para a determinação de Fe, Mn e Zn em suco de uva por FAAS.

Tempo de irradiação UV (min)	Concentração de Metais ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Fe	Mn	Zn
90	3,578 $\pm$ 0,012	2,033 $\pm$ 0,034	0,946 $\pm$ 0,020
105	3,867 $\pm$ 0,009	2,418 $\pm$ 0,051	1,017 $\pm$ 0,001
120	4,899 $\pm$ 0,403	2,550 $\pm$ 0,060	1,208 $\pm$ 0,028
135	4,932 $\pm$ 0,335	2,531 $\pm$ 0,005	1,284 $\pm$ 0,070

Analisando os resultados obtidos (Tabela 11), pode-se perceber claramente um aumento na concentração dos metais Fe, Mn e Zn quando o tempo de irradiação UV foi aumentado até 120 minutos. Porém, entre 120 e 135 minutos, não há diferença significativa entre os valores obtidos de concentração dos elementos ( $t_{obs} = 0,09$  e  $p = 0,937$  para Fe;  $t_{obs} = 0,45$  e  $p = 0,699$  para Mn;  $t_{obs} = 1,43$  e  $p = 0,290$  para Zn). Portanto, pode-se concluir que o tempo de irradiação UV de 120 minutos é suficiente para a liberação dos metais Fe, Mn e Zn presentes na amostra de suco.

Além dos efeitos principais, também foi observado um efeito de interação entre a concentração da solução tampão e o pH (Figura 10), o que indica que essas variáveis não podem ser otimizadas de forma independente.



**Figura 10.** Gráfico de interação entre a concentração da solução tampão e o pH.

Como pode ser observado no gráfico da Figura 10, em concentrações baixas da solução tampão ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ), o pH interfere pouco no processo, já que foram obtidos valores muito próximos de absorbância em pH 5 e pH 10. Porém, aumentando-se a concentração do tampão para  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , o pH 10 se torna mais eficiente na degradação da matéria orgânica, produzindo um valor de absorbância significativamente menor que em pH 5.

Sendo assim, foi realizada uma avaliação do pH da amostra 1 (suco de uva) com a utilização das diferentes concentrações de solução tampão pH 5 e pH 10, medindo-se o pH antes e após a irradiação UV de 90 minutos (Tabela 12). Para isso foi utilizada uma massa de 10,0 g de amostra, com pH inicial de 2,48, e nela foram adicionados 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% (m/v) e volumes de solução tampão pH 5 e pH 10 resultando nas concentrações de 0,05 e  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Tabela 12.** Avaliação do pH da amostra 1 (suco de uva) no processo de Foto-Oxidação UV com diferentes concentrações de solução tampão pH 5 e pH 10.

pH da Solução Tampão	Concentração da Solução Tampão ( $\text{mol L}^{-1}$ )	pH da amostra	
		Antes da irradiação UV	Após irradiação UV*
5,0	0,05	3,41	2,79
	0,25	4,31	4,05
10,0	0,05	3,50	2,86
	0,25	9,30	4,20

\*Tempo de irradiação UV: 90 minutos

Conforme os resultados apresentados na Tabela 12, pode-se observar que o aumento da concentração da solução tampão pH 5 produz pouca variação no pH da amostra de suco de uva por estar mais próximo do pH inicial da amostra (2,48). Além disso, foi verificado que o meio ácido não é adequado para o processo de Foto-Oxidação UV com esse tipo de amostra e, portanto, o aumento da concentração da solução tampão pH 5 interfere pouco na degradação da matéria orgânica. Por outro lado, utilizando-se a solução tampão de pH 10, a absorvância da amostra diminui significativamente com o aumento da concentração da mesma. Isso ocorre porque uma concentração de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  da solução tampão de amônio/cloreto de amônio não é suficiente para tamponar o meio, já que a amostra de suco possui pH ácido, devido à presença de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos tartárico, málico e cítrico (RIZZON E LINK, 2006). Porém, aumentando-se a concentração da solução tampão para  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  foi possível atingir um pH próximo de 10, o qual mostrou-se mais adequado para o tratamento desse tipo de amostra. Ao final do processo o pH torna-se ácido novamente devido à produção de ácidos orgânicos e inorgânicos provenientes das reações de oxidação (MODIRSHAHLA e BEHNAJADY, 2006).

Um estudo foi realizado para verificar o comportamento das outras amostras analisadas com relação à concentração hidrogeniônica quando submetidas ao processo de Foto-Oxidação UV. Para isso foram utilizadas as condições ótimas encontradas no planejamento fatorial ( $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de solução tampão pH 10, 2,5 mL de peróxido de hidrogênio e tempo de irradiação UV de 90 minutos). O pH das amostras foi determinado antes e após a irradiação UV, medindo-se também o pH inicial, conforme apresentado na Tabela 13.

**Tabela 13.** Avaliação do pH das amostras de sucos de fruta submetidas ao processo de Foto-Oxidação UV.

Amostra	pH		
	Inicial	Antes da irradiação UV*	Após irradiação UV**
1	2,48	9,30	4,20
2	2,93	9,57	2,90
3	3,09	9,61	3,11
4	2,53	5,29	4,45
5	2,74	9,43	3,48
6	3,19	9,16	3,55
7	3,45	9,39	3,78
8	2,80	9,18	5,86
9	2,53	9,21	4,65
10	2,33	9,16	4,69
11	1,98	8,54	4,03
12	2,72	9,36	4,76
13	2,83	9,49	4,36
14	3,31	9,60	2,80

\*Com adição de  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de solução tampão  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 10)

\*\*Adição de 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% e irradiação UV de 90 minutos

Como pode ser observado na Tabela 13, todas as amostras de suco de fruta analisadas possuem pH ácido, que variou de 1,98 a 3,45. Com a adição de  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  da solução tampão de amônio/cloreto de amônio foi possível atingir um pH alcalino (entre 8,54 e 9,61) para a maioria das amostras, com exceção do suco de maracujá, o qual passou para um pH de 5,29. Outro estudo foi realizado para verificar o efeito de pequenas variações de pH sobre a concentração determinada dos minerais Fe, Mn e Zn (Tabela 14). Para isso variou-se o pH da amostra 1 entre 8 e 10 antes de submetê-la ao processo de Foto-Oxidação UV.

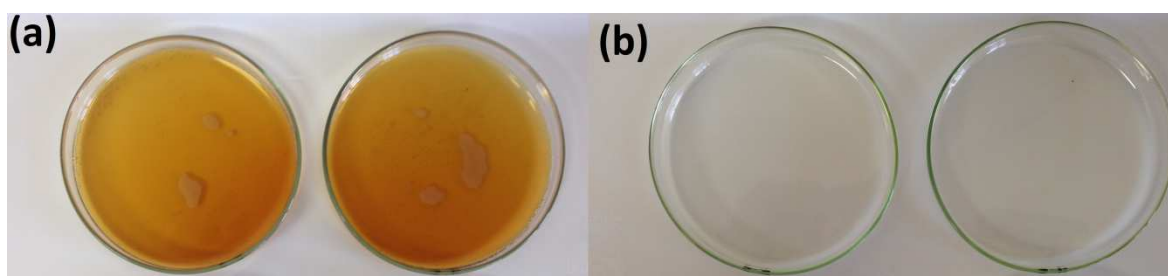
**Tabela 14.** Efeito da variação do pH da amostra 1 (suco de uva) no processo de Foto-Oxidação UV sobre as concentrações de Fe, Mn e Zn determinadas por FAAS.

pH	Concentração de Metais ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ Intervalo de confiança		
	Fe	Mn	Zn
8,0	$0,764 \pm 0,199$	$1,354 \pm 0,022$	$0,625 \pm 0,022$
8,5	$0,777 \pm 0,166$	$1,355 \pm 0,017$	$0,625 \pm 0,012$
9,0	$0,694 \pm 0,057$	$1,378 \pm 0,015$	$0,632 \pm 0,035$
9,5	$0,736 \pm 0,181$	$1,380 \pm 0,025$	$0,632 \pm 0,027$
10,0	$0,678 \pm 0,057$	$1,348 \pm 0,012$	$0,637 \pm 0,015$

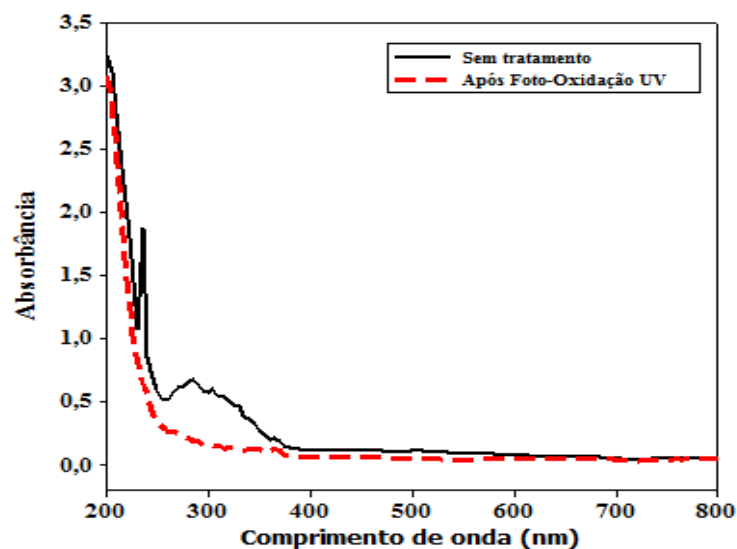
De acordo com os resultados da Tabela 14, não foram observadas variações significativas nas concentrações de Fe, Mn e Zn nas diferentes condições de pH da amostra, considerando os respectivos intervalos de confiança. Isso demonstra que o pH alcalino entre 8 e 10 é adequado para a aplicação do processo de Foto-Oxidação UV em sucos de fruta, não havendo necessidade de um controle rigoroso do pH do meio reacional.

Considerando os resultados do planejamento fatorial  $2^4$  e da otimização do tempo de irradiação UV, as condições experimentais estabelecidas para o preparo de amostra de suco de fruta por Foto-Oxidação UV foram: 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% (m/v),  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de solução tampão pH 10,0 e tempo de irradiação UV de 120 minutos. Essas condições foram utilizadas no estudo de validação do método para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.

A Figura 11 mostra as soluções da amostra 1 (suco de uva) antes e após serem submetidas à irradiação UV. Pode-se perceber claramente a redução de cor da amostra após o processo de Foto-Oxidação UV, o que evidencia a quebra de ligações de compostos orgânicos e a digestão da amostra. Isso pode ser comprovado pelos espectros da Figura 12 referentes à mesma amostra, onde pode ser observada uma redução da área espectral após o processo de Foto-Oxidação UV devido à decomposição dos compostos orgânicos.



**Figura 11.** Solução da amostra de suco de uva (a) antes da irradiação UV e (b) após a irradiação UV.



**Figura 12.** Espectros de absorção molecular UV/Visível obtidos para a amostra 1 (suco de uva) antes e após o processo de Foto-Oxidação UV.

## 5.2. Estudo de validação do processo de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta

A validação do método desenvolvido foi realizada para garantir que o mesmo atenda às exigências das aplicações analíticas para o qual foi designado e produza resultados confiáveis (BRASIL, 2003). Para isso foram avaliados os parâmetros linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão.

### 5.2.1. Curvas analíticas e linearidade

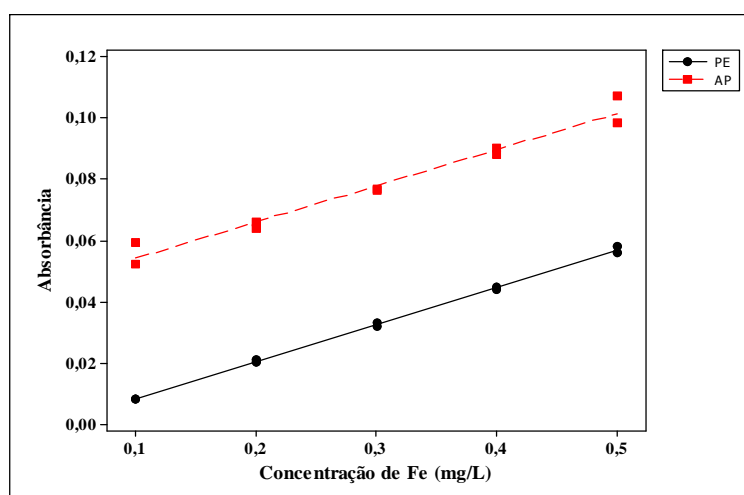
As curvas analíticas para a determinação de Fe, Mn e Zn foram obtidas por padronização externa, em solução aquosa, e por adição de padrão, em matriz de suco de fruta submetida ao processo de Foto-Oxidação UV. Esse estudo foi realizado para verificar a presença ou ausência de interferência de matriz nas análises por FAAS. Foram utilizadas duas faixas de concentração para as curvas analíticas dos elementos Fe e Mn, uma faixa menor (0,1 a 0,5 mg L<sup>-1</sup>) e uma faixa maior (0,5 a 2,5 mg L<sup>-1</sup> e 0,4 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) e apenas uma faixa de concentração para o Zn (0,1 a 0,5 mg L<sup>-1</sup>), devido à faixa de concentração do elemento na amostra de suco. Para as curvas de adição de padrão, a amostra 3 (suco de maçã) foi utilizada na faixa menor de concentração e a amostra 1 (suco de uva) na faixa maior, considerando a diferença no teor dos elementos nessas amostras. Os dados obtidos para as curvas de padrão externo (PE) e de adição de padrão (AP) dos três elementos são apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.

Metal	Tipo de calibração	Equação*
Fe	PE (faixa menor)	$A = -0,0035 + 0,1209 (\pm 0,0036)$ [Fe]
	AP (faixa menor)	$A = 0,0425 + 0,1177 (\pm 0,0165)$ [Fe]
	PE (faixa maior)	$A = -0,0034 + 0,0654 (\pm 0,0021)$ [Fe]
	AP (faixa maior)	$A = 0,0510 + 0,0727 (\pm 0,0100)$ [Fe]
Mn	PE (faixa menor)	$A = -0,0003 + 0,2799 (\pm 0,0109)$ [Mn]
	AP (faixa menor)	$A = 0,1175 + 0,2753 (\pm 0,0286)$ [Mn]
	PE (faixa maior)	$A = -0,0058 + 0,1574 (\pm 0,0084)$ [Mn]
	AP (faixa maior)	$A = 0,1568 + 0,1653 (\pm 0,0221)$ [Mn]
Zn	PE	$A = -0,0110 + 0,3810 (\pm 0,0304)$ [Zn]
	AP	$A = 0,0705 + 0,3176 (\pm 0,0490)$ [Zn]

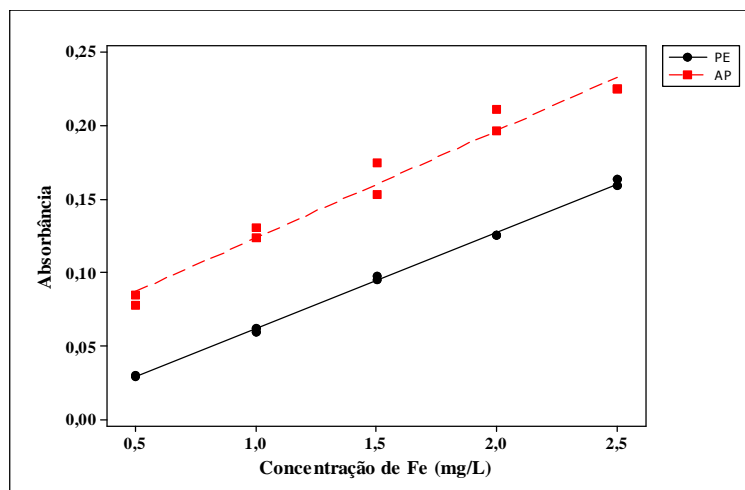
\*Intervalo de confiança dos coeficientes angulares apresentado entre parêntesis.

Comparando-se os coeficientes angulares das curvas analíticas de padrão externo e adição de padrão e os respectivos intervalos de confiança (Tabela 15) para cada elemento analisado, é possível afirmar que não há diferença significativa entre eles e, portanto, o suco de fruta não apresenta efeito de matriz. Dessa forma, as curvas analíticas de padrão externo podem ser utilizadas para a determinação de Fe, Mn e Zn em suco de fruta por FAAS aplicando-se a Foto-Oxidação UV no preparo de amostra, conforme ilustrado nas Figuras 13 a 17. Este fato representa uma grande vantagem para o método, pois aumenta a frequência analítica e diminui os custos da análise (ANDRADE *et al.*, 2014).

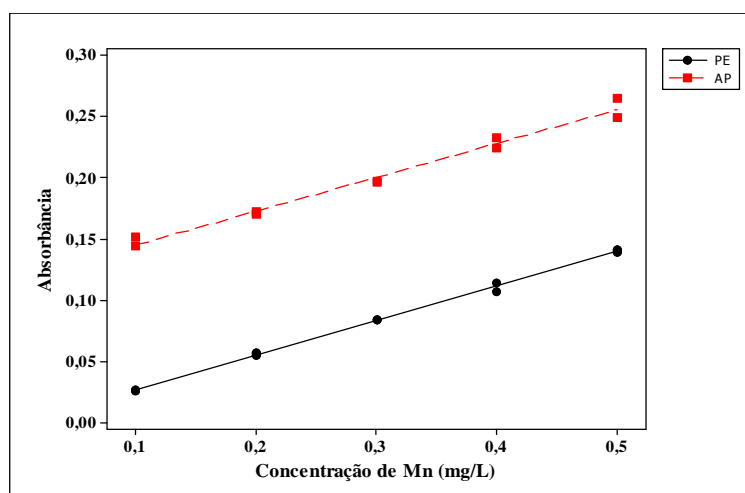


**Figura 13.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa menor de concentração para a determinação de Fe por FAAS.

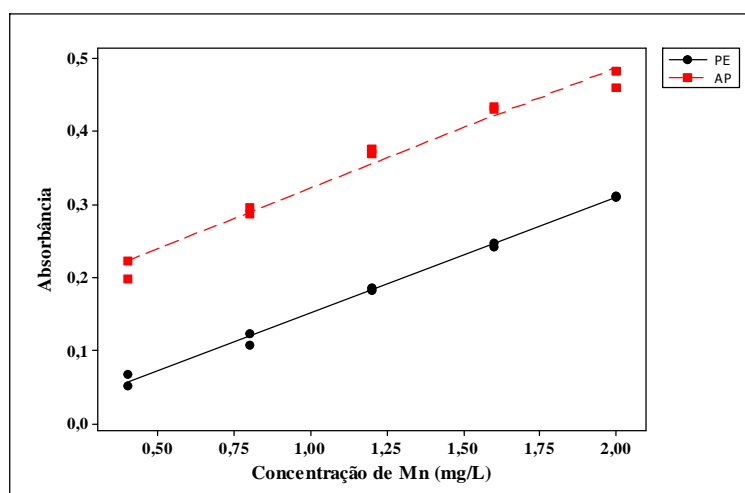




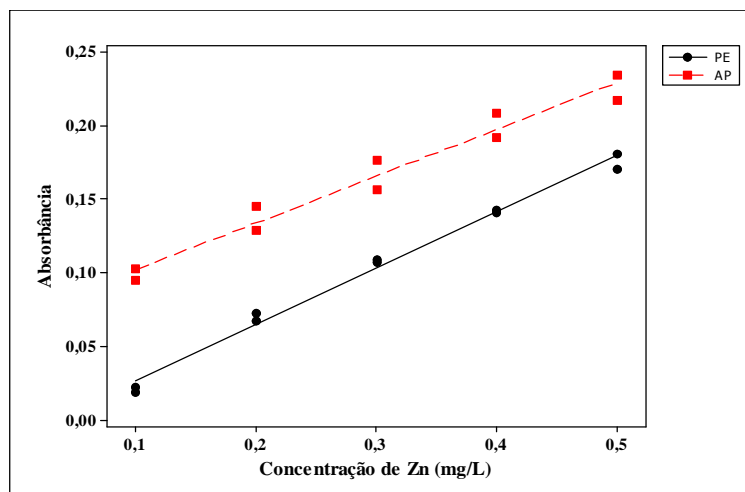
**Figura 14.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa maior de concentração para a determinação de Fe por FAAS.



**Figura 15.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa menor de concentração para a determinação de Mn por FAAS.



**Figura 16.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) com faixa maior de concentração para a determinação de Mn por FAAS.



**Figura 17.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e adição de padrão (AP) para a determinação de Zn por FAAS.

Para avaliar a linearidade das curvas de padrão externo foi aplicada a análise de regressão linear e o teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança (Tabela 16).

**Tabela 16.** Resultados da análise de regressão linear para o estudo da linearidade na determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.

Metal	Parâmetros de Regressão <sup>a</sup>				Falta de Ajuste <sup>b</sup>	
	<i>r</i>	$R^2$	$F_{regressão}$	<i>p</i> -valor	$F_{faj}$	<i>p</i> -valor
<b>Fe (faixa menor)</b>	0,999	99,9	5963,00	0,000	0,32	0,811
<b>Fe (faixa maior)</b>	0,999	99,8	5072,72	0,000	2,25	0,200
<b>Mn (faixa menor)</b>	0,999	99,8	3522,39	0,000	0,26	0,853
<b>Mn (faixa maior)</b>	0,998	99,6	1864,11	0,000	0,52	0,688
<b>Zn</b>	0,995	99,0	834,09	0,000	3,61	0,100

<sup>a</sup> $F_{crítico(0,05;1,8)} = 5,32$ ; <sup>b</sup> $F_{crítico(0,05;3,5)} = 5,41$

De acordo com os resultados observados na Tabela 16, pode-se afirmar que a regressão linear é significativa para as curvas analíticas de padrão externo dos metais Fe, Mn e Zn, pois  $F_{regressão} \gg F_{crítico}$ , com  $p < 0,05$ . Os valores do coeficiente de correlação ( $r$ ), que ficaram acima de 0,99, indicam uma possível relação linear entre a absorvância e a concentração para os metais avaliados (BRASIL, 2003). Além disso, os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) sugerem que mais de 99% da variação das respostas pode ser explicada pelo modelo linear e o restante pode ser atribuído aos resíduos (FREIRE *et al.*, 1999).

Para confirmar a linearidade das curvas analíticas, foi realizado um teste de falta de ajuste a 95% de confiança (Tabela 16). Em todos os casos, os valores de  $F_{faj}$  foram menores que os valores de  $F_{crítico}$ , com  $p > 0,05$ , indicando que a falta de ajuste não é

significativa no nível de confiança adotado e, portanto, o modelo linear pode ser ajustado. Dessa forma, as curvas analíticas de padrão externo analisadas podem ser utilizadas para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.

A significância dos coeficientes linear (*a*) e angular (*b*) das curvas analíticas de padrão externo foi avaliada pela aplicação de um teste-*t* no nível de 95% de confiança (Tabela 17).

**Tabela 17.** Avaliação estatística dos parâmetros *a* e *b* das curvas analíticas de padrão externo para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.

Curva analítica	Parâmetro <i>a</i>		Parâmetro <i>b</i>	
	<i>t</i> <sub>calculado</sub> *	<i>p</i> -valor	<i>t</i> <sub>calculado</sub> *	<i>p</i> -valor
<b>Fe (faixa menor)</b>	6,76	0,000	77,22	0,000
<b>Fe (faixa maior)</b>	2,22	0,057	71,22	0,000
<b>Mn (faixa menor)</b>	0,18	0,860	59,35	0,000
<b>Mn (faixa maior)</b>	1,21	0,262	43,18	0,000
<b>Zn</b>	2,51	0,036	28,88	0,000

\**t*<sub>crítico(0,025;8)</sub> = 2,31

Conforme os resultados da Tabela 17, é possível afirmar que o parâmetro *b* (coeficiente angular) é significativo para todas as curvas analíticas analisadas, pois  $t_{calculado} > t_{crítico}$ , com  $p < 0,05$ . Com relação ao coeficiente linear, os resultados do teste estatístico indicam que o parâmetro é significativo para as curvas de Fe com faixa menor de concentração e Zn, pois  $t_{calculado} > t_{crítico}$ , com  $p < 0,05$ . Já para as curvas de Fe com faixa maior de concentração e Mn nas duas faixas de concentração o parâmetro *a* (coeficiente linear) não é significativo, pois  $t_{calculado} < t_{crítico}$ , com  $p > 0,05$ , indicando que a curva analítica passa pela origem ( $a = 0$ ).

### 5.2.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) estão fortemente ligados à sensibilidade do método. O LD refere-se à menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e o LQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra (BRITO *et al.*, 2003). Sendo assim, esses parâmetros foram determinados, de acordo com as Equações 7 e 8 do item 3.5.2, para os dois métodos de preparo de amostra utilizados (Foto-Oxidação UV e digestão por via úmida) como forma de avaliar a sensibilidade. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Resultados do estudo de sensibilidade do método para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS.

Metal	Foto-Oxidação UV		Digestão por Via Úmida	
	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
Fe	0,0171	0,0571	0,1351	0,4502
Mn	0,0046	0,0155	0,0042	0,0142
Zn	0,0162	0,0539	0,0805	0,2683

Os valores de LD e LQ determinados (Tabela 18) utilizando o processo de Foto-Oxidação UV no preparo de amostra foram inferiores ao primeiro ponto das curvas analíticas para os três metais (0,1 mg L<sup>-1</sup>), o que indica que os analitos podem ser quantificados com precisão e exatidão adequadas na faixa de concentração investigada. Por outro lado, utilizando a digestão por via úmida, apenas o Mn apresentou valores de LD e LQ inferiores ao primeiro ponto da curva analítica, enquanto para Fe e Zn foram encontrados valores elevados de LD e LQ. Isso indica que o método não é adequado para a determinação desses metais com precisão e exatidão em baixos níveis de concentração. Com isso, pode-se dizer que o processo de Foto-Oxidação UV apresenta maior sensibilidade que o método de referência utilizado (digestão por via úmida) para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS. Esse resultado pode ser explicado pela utilização de menor volume de reagentes no processo de Foto-Oxidação UV, o que diminui a possibilidade de contaminação da amostra, aumentando assim a sensibilidade do método.

### 5.2.3. Precisão e Exatidão

As Tabelas 19, 20 e 21 apresentam as concentrações médias e os respectivos desvios padrão de Fe, Mn e Zn nas amostras de suco de fruta obtidas utilizando o processo de Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra.

**Tabela 19.** Concentrações médias de Fe obtidas em amostras de suco de fruta utilizando a Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra.

Amostra	Concentração de Fe ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	
	Foto-Oxidação UV	Digestão por Via Úmida
1	1,199 $\pm$ 0,026	1,271 $\pm$ 0,189
2	2,913 $\pm$ 0,058	3,075 $\pm$ 0,101
3	0,315 $\pm$ 0,028	< LQ
4	3,401 $\pm$ 0,009	3,415 $\pm$ 0,285
5	3,791 $\pm$ 0,036	3,728 $\pm$ 0,048
6	0,775 $\pm$ 0,060	< LQ
7	2,726 $\pm$ 0,072	2,755 $\pm$ 0,060
8	1,111 $\pm$ 0,062	< LQ
9	3,040 $\pm$ 0,050	3,266 $\pm$ 0,140
10	1,855 $\pm$ 0,018	1,751 $\pm$ 0,129
11	8,136 $\pm$ 0,340	8,520 $\pm$ 0,451
12	0,872 $\pm$ 0,113	< LQ
13	0,585 $\pm$ 0,071	< LQ
14	9,361 $\pm$ 0,313	9,324 $\pm$ 0,456

**Tabela 20.** Concentrações médias de Mn obtidas em amostras de suco de fruta utilizando a Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra.

Amostra	Concentração de Mn ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	
	Foto-Oxidação UV	Digestão por Via Úmida
1	1,401 $\pm$ 0,012	1,473 $\pm$ 0,009
2	0,737 $\pm$ 0,007	0,784 $\pm$ 0,002
3	0,365 $\pm$ 0,004	0,401 $\pm$ 0,019
4	1,314 $\pm$ 0,002	1,321 $\pm$ 0,019
5	14,228 $\pm$ 0,101	14,732 $\pm$ 0,190
6	0,327 $\pm$ 0,049	0,169 $\pm$ 0,016
7	0,554 $\pm$ 0,005	0,624 $\pm$ 0,012
8	0,516 $\pm$ 0,005	0,332 $\pm$ 0,004
9	0,759 $\pm$ 0,026	0,679 $\pm$ 0,002
10	1,131 $\pm$ 0,058	0,965 $\pm$ 0,004
11	1,019 $\pm$ 0,037	1,012 $\pm$ 0,014
12	0,530 $\pm$ 0,003	0,536 $\pm$ 0,012
13	0,536 $\pm$ 0,012	0,450 $\pm$ 0,011
14	0,566 $\pm$ 0,009	0,694 $\pm$ 0,037

**Tabela 21.** Concentrações médias de Zn obtidas em amostras de suco de fruta utilizando a Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra.

Amostra	Concentração de Zn ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	
	Foto-Oxidação UV	Digestão por Via Úmida
1	0,920 $\pm$ 0,018	1,063 $\pm$ 0,131
2	0,410 $\pm$ 0,006	< LQ
3	0,160 $\pm$ 0,001	< LQ
4	1,789 $\pm$ 0,018	2,134 $\pm$ 0,010
5	0,854 $\pm$ 0,026	0,830 $\pm$ 0,039
6	0,603 $\pm$ 0,040	< LQ
7	1,482 $\pm$ 0,079	1,391 $\pm$ 0,062
8	1,048 $\pm$ 0,007	0,966 $\pm$ 0,051
9	2,016 $\pm$ 0,044	1,628 $\pm$ 0,059
10	1,112 $\pm$ 0,090	0,918 $\pm$ 0,116
11	2,371 $\pm$ 0,225	2,398 $\pm$ 0,227
12	0,684 $\pm$ 0,105	< LQ
13	0,930 $\pm$ 0,054	0,810 $\pm$ 0,091
14	2,579 $\pm$ 0,048	2,632 $\pm$ 0,036

Como pode ser observado nas Tabelas 19 e 21, os teores de Fe nas amostras 3, 6, 8, 12 e 13 e de Zn nas amostras 2, 3, 6 e 12 obtidos com a digestão por via úmida ficaram abaixo do limite de quantificação (LQ). Por esse motivo, essas amostras foram desconsideradas nos estudos de precisão e exatidão do método proposto para esses metais.

#### 5.2.3.1. Precisão

A precisão do método de Foto-Oxidação UV otimizado foi avaliada por comparação com a digestão por via úmida utilizando-se um teste-*F* de comparação de variâncias no nível de 95% de confiança. Para isso foram utilizadas as variâncias ponderadas obtidas para cada método, considerando as diferentes amostras de suco de fruta analisadas. A precisão também foi avaliada em termos de repetitividade (*r*) e precisão intermediária (PI), considerando-se os desvios padrão relativos (DPR %) correspondentes e o valor de Horrat obtidos para amostras em dois níveis de concentração distintos. Os resultados do estudo de precisão são apresentados na Tabela 22.

**Tabela 22.** Resultados do estudo de precisão do método para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS utilizando a Foto-Oxidação UV.

Metal	Teste- <i>F</i>		r		PI		Valor de Horrat		
	<i>F</i> <sub>calculado</sub>	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>	2 <sup>f</sup>	1 <sup>e</sup>	2 <sup>f</sup>	1 <sup>e</sup>	2 <sup>f</sup>
<b>Fe</b>	2,02 <sup>a</sup>	0,310	0,502 – 8,131	3,29	1,54	3,31	1,93	0,41	0,53
<b>Mn</b>	1,05 <sup>b</sup>	0,922	0,354 – 3,142	2,03	1,87	3,79	3,38	0,72	0,90
<b>Zn</b>	1,35 <sup>c</sup>	0,641	0,364 – 5,031	2,75	1,63	4,58	3,85	0,81	0,74

<sup>a</sup> $F_{crítico(0,05;9,9)} = 4,03$ ; <sup>b</sup> $F_{crítico(0,05;14,14)} = 3,72$ ; <sup>c</sup> $F_{crítico(0,05;10,10)} = 2,86$ ; <sup>d</sup>Intervalo de confiança para a razão das variâncias no nível de 95% de confiança; <sup>e</sup>Nível baixo de concentração; <sup>f</sup>Nível alto de concentração

Os resultados do teste-*F* sugerem que não existe diferença significativa entre a precisão dos dois métodos para a determinação dos três metais, pois em todos os casos  $F_{calculado} < F_{crítico}$  e  $p > 0,05$ . Isso pode ser confirmado pelo intervalo de confiança para a razão das variâncias ponderadas, o qual possui limite inferior a 1,0 (CANO *et al.*, 2007). Com isso, pode-se dizer que a utilização do processo de Foto-Oxidação UV no preparo de amostra produz resultados com precisão similar ao método de referência utilizado para a determinação de Fe, Mn e Zn.

Com relação às estimativas de repetitividade (r), os valores de desvio padrão relativo (DPR) obtidos, que variaram de 1,54 a 3,29%, foram considerados adequados, uma vez que estão abaixo do limite máximo estabelecido pela AOAC (2012) para a faixa de concentração investigada, que é de 7,3%. O mesmo pode-se afirmar das estimativas de precisão intermediária (PI), que foram avaliadas a partir do valor de Horrat. Os valores obtidos para os três metais, que variaram de 0,41 a 0,90, são inferiores ao limite recomendado de 1,3 (AOAC,2012). Dessa forma, pode-se dizer que o método possui precisão adequada para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS.

### 5.2.3.2. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método proposto, os resultados obtidos para as amostras analisadas foram comparados com o método de referência aplicando-se um teste-*t* pareado no nível de 95% de confiança. Também foram realizados ensaios de recuperação em dois níveis de fortificação, utilizando para isso a amostra 1 (suco de uva). A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos no estudo de exatidão do método.

**Tabela 23.** Resultados do estudo de exatidão do processo de Foto-Oxidação UV para a determinação de Fe, Mn e Zn em suco de fruta por FAAS.

Metal	Teste- <i>t</i> pareado		Ensaio de Recuperação			
	<i>t</i> <sub>calculado</sub>	<i>p</i> -valor	Concentração adicionada (mg L <sup>-1</sup> )		Recuperação (%)	
			Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2
<b>Fe</b>	1,24 <sup>a</sup>	0,230	0,3	1,5	90,5	101,2
<b>Mn</b>	0,42 <sup>b</sup>	0,676	0,3	1,2	107,9	91,4
<b>Zn</b>	0,74 <sup>c</sup>	0,467	0,1	0,3	85,6	97,7

<sup>a</sup> $t_{crítico(0,025;8)} = 2,31$ ; <sup>b</sup> $t_{crítico(0,025;13)} = 2,16$ ; <sup>c</sup> $t_{crítico(0,025;9)} = 2,26$

Os resultados do teste-*t* pareado (Tabela 23) sugerem que não há diferença significativa entre as concentrações de Fe, Mn e Zn obtidas pelos dois métodos de preparo de amostra (Foto-Oxidação UV e digestão por via úmida) no nível de confiança adotado, pois em todos os casos  $t_{calculado} < t_{crítico}$  e  $p > 0,05$ . Com isso, pode-se afirmar que não existe diferença de exatidão entre os métodos analisados.

Os ensaios de recuperação realizados também indicaram boa exatidão do método de Foto-Oxidação UV, pois as taxas de recuperação obtidas, que variaram de 85,6 a 107,9%, estão dentro dos limites estabelecidos (80-110%) para a faixa de concentração investigada (AOAC, 2012).

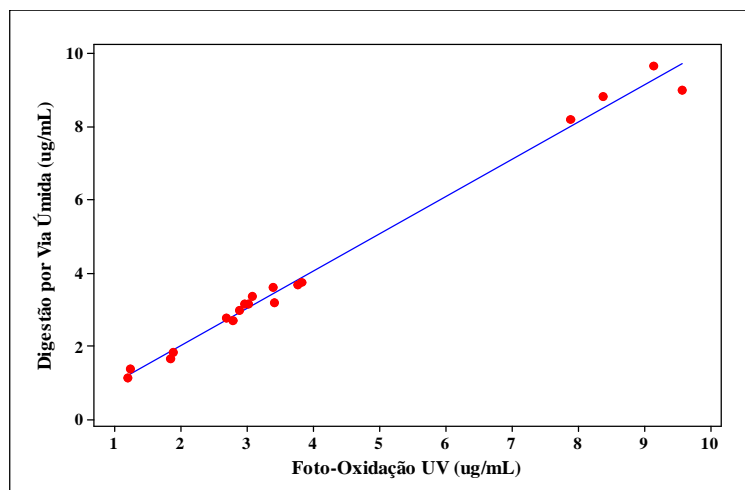
Para confirmar a exatidão do método proposto, foi aplicada uma análise por regressão linear aos resultados apresentados nas Tabelas 19, 20 e 21, no nível de 95% de confiança. Os resultados estão demonstrados na Tabela 24 e nas Figuras 18, 19 e 20.

**Tabela 24.** Resultados da análise de regressão linear para avaliação da exatidão do processo de Foto-Oxidação UV como método de preparo de amostra.

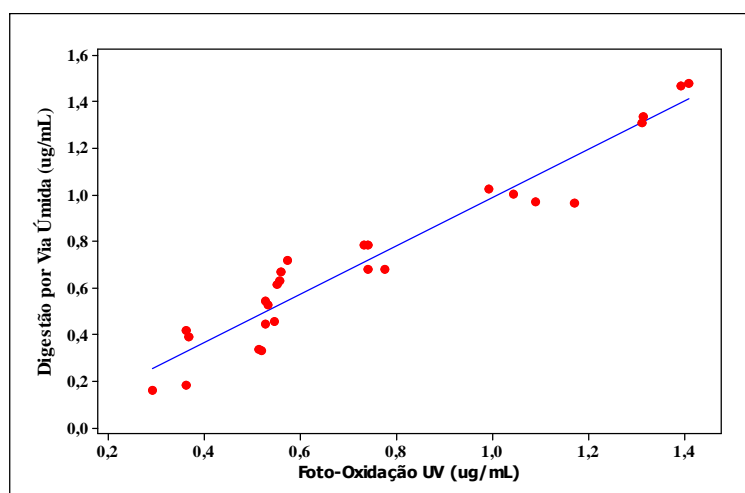
Metal	<i>F</i> <sub>regressão</sub>	<i>p</i> -valor	Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão	<i>t</i> <sub>calculado</sub>	<i>p</i> -valor
<b>Fe</b>	1831,17 <sup>a</sup>	0,000	Intercepto: 0,021 ± 0,114	0,18 <sup>d</sup>	0,859
			Inclinação: 1,014 ± 0,024	42,79 <sup>d</sup>	0,000
<b>Mn</b>	310,58 <sup>b</sup>	0,000	Intercepto: -0,052 ± 0,048	1,08 <sup>e</sup>	0,291
			Inclinação: 1,038 ± 0,059	17,62 <sup>e</sup>	0,000
<b>Zn</b>	188,11 <sup>c</sup>	0,000	Intercepto: -0,070 ± 0,122	0,58 <sup>f</sup>	0,570
			Inclinação: 1,025 ± 0,075	13,72 <sup>f</sup>	0,000

<sup>a</sup> $F_{crítico(0,05;1,16)} = 6,55$ ; <sup>b</sup> $F_{crítico(0,05;1,24)} = 5,72$ ; <sup>c</sup> $F_{crítico(0,05;1,18)} = 5,87$ ; <sup>d</sup> $t_{crítico(0,025;16)} = 2,12$ ; <sup>e</sup> $t_{crítico(0,025;24)} = 2,06$ ; <sup>f</sup> $t_{crítico(0,025;18)} = 2,10$

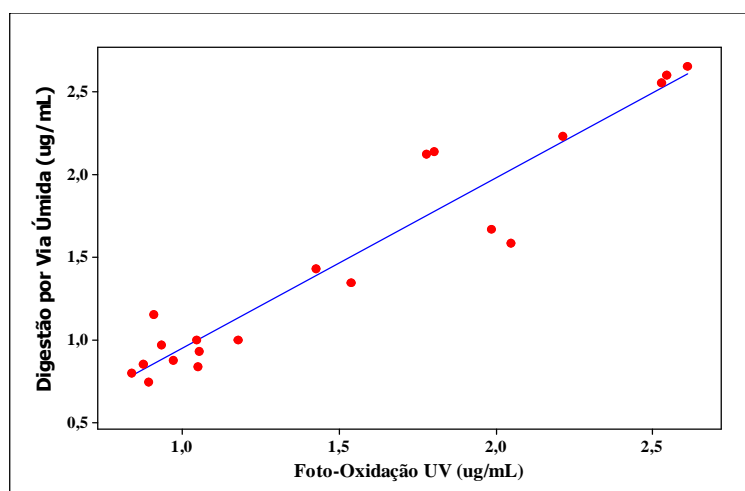




**Figura 18.** Comparação por regressão linear entre o processo de Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra para a determinação de Fe por FAAS.



**Figura 19.** Comparação por regressão linear entre o processo de Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra para a determinação de Mn por FAAS.



**Figura 20.** Comparação por regressão linear entre o processo de Foto-Oxidação UV e a digestão por via úmida no preparo de amostra para a determinação de Zn por FAAS.

Os valores de  $F_{regressão}$  observados na Tabela 24 sugerem que os teores de Fe, Mn e Zn obtidos por ambos os métodos de preparo de amostra apresentam uma relação linear entre si no nível de confiança utilizado. Isso pode ser observado também pelos gráficos das Figuras 18 a 20, que demonstram um bom ajuste linear entre os resultados dos dois métodos.

Além disso, foi aplicado um teste- $t$  para verificar a significância dos coeficientes linear (intercepto) e angular (inclinação) da regressão. De acordo com os resultados (Tabela 24), é possível afirmar que os valores de inclinação são estatisticamente iguais a 1,0 para os três metais, pois  $t_{calculado} > t_{crítico}$  ( $p < 0,05$ ), enquanto os valores dos interceptos são estatisticamente iguais a 0, pois  $t_{calculado} < t_{crítico}$  ( $p > 0,05$ ).

A partir desses resultados pode-se dizer que os métodos de preparo de amostra investigados (digestão por via úmida e Foto-Oxidação UV) não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos. Estes fatos comprovam que o método de preparo de amostra pelo processo de Foto-Oxidação UV produz resultados com boa exatidão para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS.

## 6. CONCLUSÃO

O processo de Foto-Oxidação UV mostrou-se adequado no preparo de amostras de sucos de fruta para a determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS. Esse método possui diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como simplicidade, rapidez, menor custo e menor geração de resíduos tóxicos.

Com a aplicação de análise multivariada na otimização do método de Foto-Oxidação UV foi possível visualizar a influência dos fatores envolvidos, assim como os efeitos de interação entre eles, além de reduzir o número de ensaios necessários quando comparado à otimização univariada. Dessa forma, foram estabelecidas com o planejamento fatorial  $2^4$  as condições experimentais adequadas para o preparo de amostras de suco de fruta por Foto-Oxidação UV, sendo um volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% (m/v) de 2,5 mL, concentração de  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de solução tampão  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  com pH 10 e tempo de irradiação UV de 120 minutos.

O estudo de validação realizado comprovou a eficiência do método, já que os parâmetros avaliados (linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão) ficaram dentro dos critérios recomendados pela literatura.

De acordo com o estudo de otimização e validação da metodologia de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra para a determinação de Fe, Mn e Zn em sucos de fruta por FAAS, torna-se viável a sua utilização em laboratórios de controle de qualidade e indústrias, pois este é capaz de produzir resultados exatos e precisos, além de apresentar maior sensibilidade quando comparada aos métodos convencionais de preparação de amostra. Assim, o processo de Foto-Oxidação UV representa uma alternativa eficaz no tratamento de diferentes amostras para a determinação de metais por FAAS, com baixo consumo de reagentes e utilização de reagentes menos corrosivos, proporcionando maior segurança ao analista e menor poluição do meio ambiente.

## 7. REFERÊNCIAS

AMORIN, F. A. C.; LOBO, I. P.; SANTOS, V. L. C. S.; FERREIRA, S. L. C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.

ANDRADE, C. K. de.; ANJOS, V. E. dos.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.; QUINÁIA, S. P. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 146, p. 166-173, 2014.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **AOAC Official Methods of Analysis**. Apêndice F. Washington, 2012.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224-2234, 2009.

ARMSTRONG, F. A. J.; WILLIAMS, P. M.; STRICKLAND, J. D. H. Photooxidation of organic matter in sea water by ultra-violet radiation analytical and other applications. **Nature**, v. 211, p. 481-&, 1966. *apud* BRANDÃO, G. C. **Estratégias alternativas de preparo de amostras para a determinação de metais em alimentos por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama**. Salvador, 2010. 95p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Federal da Bahia.

ASCHNER, M. Manganese: Brain Transport and Emerging Research Needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 3, p. 429-432, 2000.

BARROS, R. R. **Consumo de alimentos industrializados e fatores associados em adultos e idosos residentes no município de São Paulo**. São Paulo, 2008. 176p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo.

BAZZANO, L. A.; HE, J.; OGDEN, L. G.; LORIA, C. M.; VUPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P. K. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 96-99, 2002.

BENDICHO, C.; PENA, F.; COSTAS, M.; GIL, S.; LAVILLA, I. Photochemistry-based sample treatments as greener approaches for trace-element analysis and speciation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 681-691, 2010.

BEZERRA, M. A.; SOUZA, A. D. S.; OLIVEIRA, R. V.; OLIVEIRA, D. M.; CARDOSO, L. A. M.; SOUSA FILHO, H. R. Use of Doehlert and constrained mixture designs in the development of a photo-oxidation procedure using UV radiation/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for decomposition of landfill leachate samples and determination of metals by flame atomic absorption spectrometry. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 3-13, 2015.

BORGHEI, S. M.; HOSSEINI, S. N. Comparison of furfural degradation by different photooxidation methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 139, p. 482-488, 2008.

BOWMAN, A. B.; KWAKYE, G. F.; HERNÁNDEZ, E. H.; ASCHNER, M. Role of manganese in neurodegenerative diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, p. 191-203, 2011.

BRANDÃO, G. C. **Estratégias alternativas de preparo de amostras para a determinação de metais em alimentos por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama**. Salvador, 2010. 95p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Federal da Bahia.

BRANDÃO, G. C.; AURELIANO, M. O.; SAUTHIER, M. C. S.; SANTOS, W. N. L. Photo-oxidation using UV radiation as a sample preparation procedure for the determination of copper in fruit juices by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 4, p. 855-858, 2012.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE n. 899, 12 p., 2003.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais**. Resolução RDC n. 269, 6 p., 2005.

BRASIL. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, Revisão 04, Julho de 2011. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto n. 6871, de 04 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.1, de 07 de janeiro de 2000**. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7777>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.12, de 04 de setembro de 2003**. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/pdf/instrucao-normativa-12.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.19, de 19 de junho de 2013**. Estabelece em todo território nacional a complementação dos padrões de identidade e qualidade para refresco, refrigerante, bebida composta, chá pronto para consumo e soda. Disponível em: <[http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/legislacao/INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_No\\_19\\_DE\\_19\\_DE\\_JUNHO\\_DE\\_2013\\_\\_\\_pic\\_bebidas\\_n\\_alcoolicas.pdf](http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/legislacao/INSTRUCAO_NORMATIVA_No_19_DE_19_DE_JUNHO_DE_2013___pic_bebidas_n_alcoolicas.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.24, de 30 de agosto de 2012.** Fixa a quantidade mínima de cinquenta por cento de polpa ou suco de uva no Néctar de Uva. Disponível em: <[http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/legislacao/INSTRUO\\_NORMATIVA\\_24\\_2012.pdf](http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/legislacao/INSTRUO_NORMATIVA_24_2012.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei n. 8918, de 14 de julho de 1994.** Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n.544, de 16 de novembro de 1998.** Aprova os Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. Disponível em: <<http://www.ivegetal.com.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Referenciada/Portaria%20N%C2%BA%20544%20de%2016%20de%20novembro%20de%201998.htm>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. de A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRITTO, J. M.; RANGEL, M. do C. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 114-122, 2008.

BRUCH, K. L. **Nem tudo que tem uva é suco.** Bento Gonçalves: IBRAVIN, 2012. 12p.

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of the sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 47-70, 2002.

CANO, C. B.; FELSNER, M. L.; BRUNS, R. E. Precisão dos métodos refratométricos para análise de umidade em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 328-332, 2007.

CANTLE, J. E. Practical techniques. In: \_\_\_\_, ed. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry – Atomic Absorption Spectrometry.** Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1982. cap. 3, p. 37-66.

CAPELO-MARTÍNEZ, J.L.; XIMÉNEZ-EMBÚN, P.; MADRID, Y.; CÁMARA, C. Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 331-340, 2004.

CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; NÓBREGA, A. W. da; ABRANTES, S. de M. P. Validação de método para a determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 63-72, 2010.

CARNEIRO, A.P. de G.; ABREU, D. A.; SOARES, D. J.; COSTA, E. de A.; SILVA, L. M. R. da; BARBOSA, L. C.; SOUSA, P. H. M. de; FIGUEIREDO, R. W. de. Avaliação da rotulagem, caracterização química, físico-química e reológica de néctares de uva comercializados na cidade de Fortaleza-CE. **Alimentos e Nutrição / Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 241-249, 2013.

CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G. R. O. O Uso de Radiação Ultravioleta para o Pré-tratamento de Amostras em Análise Inorgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 913-921, 2003.

CENCI, S. A. Boas Práticas de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças na Agricultura Familiar. In: NETO, F. do N., org. **Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, p. 67-80.

CHINNICI, F.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C.; AMATI, A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 121-130, 2005.

COSTA, E. M. **Estratégias para caracterização da farinha de mandioca produzida no estado da Bahia**. Salvador, 2012. 119p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia.

DARMON, N.; DARMON, M.; MAILLOT, M.; DREWNOWSKI, A. A nutrient density standard for vegetables and fruits: nutrients per calorie and nutrients per unit cost. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 12, p. 1881-1887, 2005.

DESPINA-MARIA, B.; MARIA, B.; AURICA-BREICA, B.; LIANA, A.; NICOLETA, F.; ROXANA, P.; LUMINITA, P.; I, G.; S., A. Studies regarding speciation and chemical fingerprinting as fruit products quality markers. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 101-105, 2011.

DIONÍSIO, A. G. G.; JESUS, A. M. D.; AMAIS, R. S.; DONATI, G. L.; MIRANDA, K. S.; GUERRA, M. B. B.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Old and New Flavors of Flame (Furnace) Atomic Absorption Spectrometry. **International Journal of Spectroscopy**, v. 2011, p. 1-30, 2011.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 75p. 1998.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; HURRELL, R. F. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutrition Research Reviews**, v. 9, p. 295-324, 1996.

FERRAREZI, A. C.; SANTOS, K. O.; MONTEIRO, M. Avaliação crítica da legislação brasileira de sucos de fruta, com ênfase no suco de fruta pronto para beber. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 667-677, 2010.

FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. **Eclética Química**, v. 27, n. 1, 2002.

FERREIRA, M. A. **Otimização e validação de metodologias analíticas alternativas para a determinação de Mn, Zn, Mg e Fe em açúcar mascavo utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS)**. Guarapuava, 2016. 128p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual do Centro-Oeste.

**FOOD INGREDIENTS BRASIL**. Dossiê: os minerais na alimentação. n. 4, jul.-ago. 2008. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/52.pdf>>. Acesso em: 27 mai. 2016.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 235-244, 2005.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 180, p. 23-32, 2002.

FREIRE, C. A. D. L.; CHARNET, E. M. R.; BONVINO, H.; CHARNET, R. **Análise de modelos de regressão linear com aplicações**. Campinas: Unicamp, 1999, 356 p.

FRIMMEL, F.; WINKLER, H.A. Z. Wasser Abwasser Forsch. v. 8, p. 67, 1975. *apud* BRANDÃO, G. C. **Estratégias alternativas de preparo de amostras para a determinação de metais em alimentos por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama**. Salvador, 2010. 95p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Federal da Bahia.

FSSAI – Food Safety and Standards Authority of India. **Manual of Methods of Analysis of Foods – Metals**. Ministry of Health and Family Welfare Government of India, New Delhi, 2012.

FUGEL, R.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparation and jams – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 433-441, 2005.

GAMA, M. R. Processos Fenton como Alternativa na Remoção de Interferentes Endócrinos e outros Micropoluentes Ambientais. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 777-787, 2012.

GOMES, L. M. **Estudo de Otimização do Processo Fenton para o Descoramento de Corantes Azo**. São Carlos, 2009. 106p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

GROMBONI, C. F.; CARAPELLI, L.; PEREIRA-FILHO, E. R.; NOGUEIRA, A. R. A. Evaluation of Different Sample Preparation Procedures Using Chemometrics: Comparison Among Photo-Fenton Reaction, Microwave Irradiation, and Direct Determination of Minerals in Fruit Juices. **Food Analytical Methods**, v. 3, p. 98-103, 2010.

GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C. Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review. **Pedosphere**, v. 24, n. 1, p. 13-38, 2014.

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. New York: McGraw-Hill, 2000.



HOE, V. B.; SIONG, K. H. The nutritional value of indigenous fruits and vegetables in Sarawak. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, n.1, p. 24-31, 1999.

HOENIG, M.; KERSABIEC, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p. 1297-1307, 1996.

JALBANI, N.; KAZI, T. G.; ARAIN, B. M.; JAMALI, M. K.; AFRID, H. I.; SARFRAZ, R. A. Application of factorial design in optimization of ultrasonic-assisted extraction of aluminum in juices and soft drinks. **Talanta**, v. 70, p. 307-314, 2006.

KORN, M. das G. A.; MORTE, E. S. da B.; SANTOS, D. C. M. B. dos; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C. dos; SANTOS, E. B. G. N. dos; KORN, M. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods – A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 67-92, 2008.

KREJPCIO, Z.; SIONKOWSKI, S.; BARTELA J. Safety of Fresh Fruits and Juices Available on the Polish Market as Determined by Heavy Metal Residues. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 14, n. 6, p. 877-881, 2005.

LAMBLE, K. J.; HILL, S. J. Microwave digestion procedures for environmental matrices. **Analyst**, v. 123, 1998.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical processes for water treatment. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 671-698, 1993.

LIMA, C. M.; MENDES, D. R. G. Efeitos nocivos causados por bebidas industrializadas. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 2. p. 165-177, 2013.

MACHADO, L. L. **Utilização de compósito carvão/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e pirita como catalisadores da peroxidação de efluentes têxteis**. Florianópolis, 2007. 168p. Dissertação de Mestrado – Centro Tecnológico – Universidade Federal de Santa Catarina.

MILLIKAN, M. Nutritional Metals in Foods by AAS. In: FARRUKH, M. A., ed. **Atomic Absorption Spectroscopy**. Intechopen, 2012. cap. 8, p. 143-166.

MINITAB - **Minitab Incorporation**. Version 16.2.2, USA, 2010.

MODIRSHAHLA, N.; BEHNAJADY, M. A. Photooxidative degradation of Malachite Green (MG) by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Influence of operational parameters and kinetic modeling. **Dyes and Pigments**, v. 70, p. 54-59, 2006.

MURUGANANDHAM, M.; SWAMINATHAN, M. Photochemical oxidation of reactive azo dye with UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. **Dyes and Pigments**, v. 62, p. 269-275, 2004.

NASCENTES, C.C.; ARRUDA, M.A.Z.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 64, p. 912-917, 2004.

NATA. **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. 32 p., 2012.

NOGUEIRA, R. F. P.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R. A.; VILLA, R. D. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 400-408, 2007.

OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

ONIANWA, P. C.; ADETOLA, I. G.; IWEGBUE, C. M. A.; OJO, M. F.; TELLA, O. O. Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks. **Food Chemistry**, v. 66, p. 275-279, 1999.

ONIANWA, P. C.; ADEYEMO, A. O.; IDOWU, O. E.; OGABIELA, E. E. Copper and zinc contents og Nigerian foods and estimates of the adult dietary intakes. **Food Chemistry**, v. 72, p. 89-95, 2001.

PATNAIK, P. **Dean's Analytical Chemistry Handbook**. 2.ed. McGraw-Hill, 2004.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.1, p. 98-103, 2006.

RABIN, O.; HEGEDUS, L.; BOURRE, J.; SMITH, Q. R. Rapid Brain Uptake of Manganese(II) Across the Blood-Brain Barrier. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 2, p. 509-517, 1993.

REKHA, C.; POORNIMA, G.; MANASA, M.; ABHIPSA, V.; PAVITHRA DEVI, J.; VIJAY KUMAR, H. T.; PRASHITH KEKUDA, T. R. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. **Chemical Science Transactions**, v. 1, n. 2, p. 303-310, 2012.

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

RIBEIRO, A. R.; NUNES, O. C.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. **Environment International**, v. 75, p. 33-51, 2015.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de Validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RIMM, E.B. Fruit and vegetables - building a solid foundation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 1-2, 2002.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 750-756, 2005.

RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 689-692, 2006.

ROBINSON, J. W. Basic principles. In: CANTLE, J. E., ed. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry – Atomic Absorption Spectrometry**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1982. cap. 1, p. 1-14.

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**, v. 45, p. 79-92, 2013.

ROCHA, D. L.; KAMOGAWA, M. Y.; ROCHA, F. R. P. A critical review on photochemical conversions in flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 896, p. 11-13, 2015.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques**. 2.ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C; ZIEMONS, E. OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SAEID, S.; BEHNAJADY, M. A. Photooxidative Removal of Phenazopyridine by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Process in a Batch Re-circulated Annular Photoreactor: Influence of Operational Parameters. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 1211-1214, 2015.

SANTOS, W. N. L. dos; BRANDÃO, G. C.; PORTUGAL, L. A.; DAVID, J. M.; FERREIRA, S. L. C. A photo-oxidation procedure using UV radiation / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for decomposition of wine samples – Determination of iron and manganese content by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 601-604, 2009.

SANTOS, Y. M. G. dos. Contextualização sobre frutas e hortaliças. In: OLIVEIRA, E. N. A. de; SANTOS, D. da C, orgs. **Tecnologia e Processamento de Frutos e Hortaliças**. Natal: IFRN, 2015. cap. 1, p. 11-14.

SANTOS, D. da C; OLIVEIRA, E. N. A. de. Processamento de frutas. In: \_\_\_\_\_, orgs. **Tecnologia e Processamento de Frutos e Hortaliças**. Natal: IFRN, 2015. cap. 3, p. 37-69.

**SBRT – Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Dossiê Técnico: Conservação de Hortaliças. 2006. Disponível em: <<http://respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MzE=>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

SCHERZ, H.; KIRCHHOFF, E. Trace elements in foods: Zinc contents of raw foods – A comparison of data originating from different geographical regions of the world. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 420-433, 2006.

SHANKAR, R.; SHIM, W. J.; AN, J. G.; YIM, U. H. A practical review on photooxidation of crude oil: Laboratory lamp setup and factors affecting it. **Water Research**, v. 68, p. 304-315, 2015.

SILVA, P. T.; FIALHO, E.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Sucos de laranja industrializados e preparados sólidos para refrescos: Estabilidade química e físico-química. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 597-602, 2005.

SIMÓN, B. F.; PÉREZ-ILZARBE, J.; HERNÁNDEZ, T.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; ESTRELLA, I. Importance of Phenolic Compounds for the Characterization of Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1531-1535, 1992.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de Análisis Instrumental**. 5.ed. Madrid: McGraw-Hill, 2001.

SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.T. **Fundamentos de Química Analítica**. 8.ed. (Tradução norte-americana). São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SNEDDON, J. Atomic Absorption Spectrometry. In: SETTLE, F., ed. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. cap. 20, p. 373-394.

SOARES, L. M. V.; SHISHIDO, K.; MORAES, A. M. M.; MOREIRA, V. A. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 202-206, 2004.

SOETAN, K. O.; OLAIYA, C. O.; OYEWOLE, O. E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5, p. 200-222, 2010.

SPADA, P. D. S.; BORTOLINI, G. V.; PRÁ, D.; SANTOS, C. E. I.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. Macro and microminerals: are frozen fruits a good source? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 861-867, 2010.

STOCKL, D.; D'HONDT, H.; THIENPONT, L. M. Method Validation across the disciplines – Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2180-2190, 2009.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M. Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3466-3472, 2013.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; JEDRYCZKO D.; POHL, P. Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 69-80, 2014.

TAMBOSI, J. L. **Remediação de efluente da indústria de papel e celulose por processos oxidativos avançados e coagulação férrica**. Florianópolis, 2005. 131p. Dissertação de Mestrado – Centro Tecnológico – Universidade Federal de Santa Catarina.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Processos Oxidativos Avançados: conceitos teóricos**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Instituto de Química (IQ) - Laboratório de Química Ambiental (LQA), 2004. Caderno Temático, v. 3. 83 p.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOGNON, A. L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais**. Ribeirão Preto, 2012. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 701-705, 1996.

WELZ, B. Atomic Absorption Spectrometry. In: SEILER, H. G.; SIGEL, A.; SIGEL, H., eds. **Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1994. cap. 6, p. 85-106.

WHITNEY, E.; ROLFES, S. R. **Nutrição 1: entendendo os nutrientes**. 10.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 342p.

YANG, W.; ZHOU, H.; CICEK, N. Treatment of Organic Micropollutants in Water and Wastewater by UV-based Processes: A Literature Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 1443-1476, 2014.

YONG, L.; ARMSTRONG, K. C.; DANSBY-SPARKS, R. N.; CARRINGTON, N. A.; CHAMBERS, J. Q.; XUE, Z. L. Quantitative Analysis of Trace Chromium in Blood Samples. Combination of the Advanced Oxidation Process with Catalytic Adsorptive Stripping Voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 7582-7587, 2006.