

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM QUÍMICA - PPGQ/UNICENTRO  
MESTRADO EM QUIMICA APLICADA

ERICKA JOHANNA DIAZ MENDIVELSO

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM  
PARA A DETERMINAÇÃO DE IONS METALICOS EM CHIA (*Salvia hispanica L.*)

GUARAPUAVA-PR  
2016

ERICKA JOHANNA DIAZ MENDIVELSO.

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM  
PARA A DETERMINAÇÃO DE IONS METÁLICOS EM CHIA (*Salvia hispanica L.*)

Dissertação apresentada sob a orientação da  
Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner, como  
requisito para obtenção do Título de Mestre em  
Química, pelo Programa de Pós-Graduação em  
Química Aplicada, na Universidade Estadual do  
Centro-Oeste.

GUARAPUAVA-PR  
2016

## **AGRADECIMENTOS.**

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse na minha vida, por ter me ensinado a superar as dificuldades e colocar no meu caminho pessoas maravilhosas.

À minha mãe que amo com todo o meu coração que sempre me disse que na vida nada é fácil, mas que com esforço e dedicação os sonhos se tornam realidade.

À minha irmã que sempre é cúmplice das minhas aventuras.

À meu pai que sempre nos momentos mais difíceis me disse que tudo vai dar certo.

Agradeço ao meu namorado que veio da Colômbia para ficar comigo enchendo-me de amor, força e motivação, além disso, aguentando minhas crises de choro que foram muitas.

Em especial, um agradecimento a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Maria Lurdes Felsner por sua dedicação, gentileza e pela infinita paciência que teve comigo. Obrigada Professora Malu pelos ensinamentos e pela disponibilidade para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório LabGati Irineo keite Filho, Marieli Ferreira, Jeferson Meira dos Santos, Luciane Miranda e um especial agradecimento a Fernanda Galvão e Mariane Butik pela ajuda e disposição para ensinar-me a manipular os equipamentos.

Uma dedicação especial ao meu amigo Chalder Nogueira Nunes pela amizade conquistada durante este período, por me auxiliar quando eu precisava. Você é muito bem vindo a Colômbia, muito obrigada.

Agradeço também a todos os professores da pós-graduação em química pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante o mestrado.

À organização dos Estados Americanos (OEA) e ao grupo Coimbra de Universidades Brasileiras.

À UNICENTRO e ao Programa de Pós-graduação em Química

Enfim, a todos que de alguma forma me apoiaram e me ajudaram para a culminação deste projeto.

*Não adianta se entregar aos sonhos se você se esquece de viver.*

*J.K. Rowling*

*Eu conheço um lugar onde nós podemos continuar, eu conheço um lugar onde nós podemos continuar. Nós podemos seguir em frente, nós podemos continuar.*

*Bob Marley*

*Você pode dizer que eu sou um sonhador, mas eu não sou o único. Espero que um dia, você junte-se a nós. E o mundo viverá como um só.*

*John Lennon.*

## RESUMO

A chia (*Salvia hispanica* L.) apresenta constituintes nutricionais importantes, caracterizando-se por altos teores de ácidos graxos e de minerais. Apesar de ser reconhecida como uma fonte de minerais importantes os estudos referentes à determinação destes ainda são escassos, possivelmente devido às dificuldades no tratamento da amostra, já que a chia apresenta um alto teor de matéria orgânica que dificulta o preparo da amostra e a determinação dos metais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar a extração assistida por ultrassom como um método de preparo de amostra para a determinação de íons metálicos em farinhas e sementes de chia utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS). Para a otimização da extração assistida por ultrassom foi aplicado um planejamento fatorial  $2^2$ , em que foram estudadas a concentração de ácido nítrico como solução extratora e o tempo de extração no banho de ultrassom. Os resultados do planejamento fatorial permitiram estabelecer como condições ótimas um tempo de extração de 30 minutos e 5% (v/v) de ácido nítrico como solução extratora para a determinação de Mn, Zn e Mg e se verificou que são necessários mais estudos para otimizar as condições de extração de Fe e Ca. Para confirmar a confiabilidade do método otimizado foi realizada a validação do mesmo, avaliando-se os parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão, pela aplicação de diferentes métodos estatísticos. As curvas analíticas empregadas foram de padrão externo apresentando boa linearidade na faixa de concentração investigada, com valores de  $F_{regressão} > F_{crítico}$  e sem falta de ajuste. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) ficaram abaixo do primeiro ponto da curva analítica, indicando que os analitos podem ser quantificados em baixas concentrações. A precisão do método foi verificada por meio das variâncias ponderadas entre dois métodos de preparo de amostra (digestão por via úmida e extração assistida por ultrassom), aplicando-se um teste- $F$ , e os valores obtidos foram inferiores ao  $F_{crítico}$  com  $p > 0,05$ , indicando que não existem diferenças significativas de precisão entre os métodos de preparo de amostra comparados. A precisão também foi avaliada por meio dos desvios padrão relativos (RSD (%)) os quais apresentaram valores inferiores aos recomendados pela AOAC na faixa de concentrações investigadas para Mn e Zn (RSD < 5,3%) bem como para Mg (RSD < 3,7%). A exatidão foi avaliada pela comparação com um método de referência (digestão por via úmida), aplicando-se um teste- $t$  pareado e a análise de regressão linear para amostras de sementes e farinhas de chia. Os resultados obtidos para o teste- $t$  indicaram que não existem diferenças significativas de exatidão entre os métodos comparados, uma vez que os valores encontrados para  $t_{observado} < t_{crítico}$  com valores de  $p > 0,05$ . Além disso, a análise de regressão linear mostrou valores elevados de  $F_{regressão}$  confirmando que os modelos lineares para Mn, Zn e Mg são adequados e os teores destes íons metálicos apresentam uma correlação linear entre os métodos de preparo de amostra estudados. Desta forma, pode-se sugerir que a metodologia desenvolvida apresenta boa exatidão e precisão e pode ser aplicada no controle de qualidade de farinhas e sementes de chia com vantagens em relação aos métodos convencionais de preparo de amostra como rapidez, baixo custo operacional e redução de resíduos tóxicos.

**Palavras chave:** *Extração assistida por ultrassom, sementes e farinhas de chia, metais, espectrometria de absorção atômica por chama, validação de método.*

## ABSTRACT

The chia (*Salvia hispanica* L.) provides important nutritional constituents, characterized by high levels of fatty acids and minerals. Despite being recognized as an important source of minerals the studies on the determination of these are still scarce, possibly because of the difficulties in the treatment of the sample, as chia has a high content of organic matter which makes the sample preparation and the determination of metals. Thus, the aim of this study was to optimize and validate the extraction assisted by ultrasound as a sample preparation method for the determination of metal ions in chia seed flour and using the Atomic Absorption Spectrometry in Flame (FAAS). To optimize the extraction assisted by ultrasound was applied to an experimental design  $2^2$  in which have been studied the concentration of nitric acid as the extraction solution and the extraction time in the ultrasonic bath. The results of the factorial design allowed set as optimal conditions a 30 minute extraction time and 5% (v / v) nitric acid as the extracting solution for the determination of Mn, Zn, Mg and found that further studies to optimize the Fe and Ca extraction conditions to confirm the reliability of the optimized method validation of the same was carried out by evaluating the linearity parameters, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision and accuracy, the application of different statistical methods. The used analytical curves were external standard showed good linearity in the concentration range investigated, with  $F_{\text{regression}}$  values  $> F_{\text{critical}}$  and without lack of fit. The limits of detection (LD) and quantitation (LOQ) were below the first point of the calibration curve, indicating that the analyte can be quantified at low concentrations. The accuracy of the method was verified by the variance weighted between two sample preparation methods (digestion by wet and extraction assisted by ultrasound), applying an test  $F$ , and the values obtained were lower than  $F_{\text{critico}}$  with  $p > 0.05$ , indicating that there are no significant differences in accuracy between the sample preparation methods compared. Precision was also evaluated by the relative standard deviation (RSD (%)) which showed lower values than those recommended by the AOAC in the range of concentrations investigated for Mn and Zn (RSD  $< 5.3\%$ ) as well as Mg (RSD  $< 3.7\%$ ). Accuracy was assessed by comparison with a reference method (digestion wet), applying a paired t-test and linear regression analysis for samples of seeds and chia flour. The results obtained for the test- $t$  showed no significant differences in accuracy between the compared methods, since the values found for  $t_{\text{calculated}} < t_{\text{critical}}$  with  $p < 0.05$  values. In addition, linear regression analysis showed high values of  $F_{\text{regressão}}$  confirming that linear models for Mn, Zn and Mg are adequate and the contents of these metal ions show a linear correlation between the sample preparations methods studied. Thus, it can be suggested that this methodology has good accuracy and precision and can be applied in the quality control of flour and chia seeds with advantages over conventional sample preparation methods such as speed, low operating costs and reduced toxic waste.

**Key words:** assisted extraction ultrasound, seeds and chia flour, metals, atomic absorption spectrometry flame, method validation

## Sumario

<b>Agradecimentos</b> .....	ii
<b>Resumo</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Sumário</b> .....	vi
<b>Listas de Tabelas</b> .....	viii
<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Listas de Siglas, Símbolos e Abreviaturas</b> .....	x
CAPITULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
1.1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. OBJETIVOS .....	4
1.2.1. Objetivo geral .....	4
1.2.2. Objetivos específicos .....	4
CAPITULO 2: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	5
2.1. Chia ( <i>Salvia hispanica L.</i> ) .....	5
2.1.1. Características físicas e classificação taxonômica da chia ( <i>Salvia hispanica L.</i> ).....	5
2.1.2. Composição química e nutricional .....	6
2.1.3. Antioxidantes.....	6
2.1.4. Ácidos graxos ômega-3 .....	7
2.1.5. Proteínas .....	8
2.1.6. Vitaminas.....	8
2.1.7. Composição mineral da chia.....	9
2.2. MINERAIS E SUA IMPORTANCIA NO ORGANISMO .....	9
2.2.1. Magnésio .....	10
2.2.2. Cálcio.....	11
2.2.3. Ferro .....	12
2.2.4. Manganês.....	12
2.2.5. Zinco.....	13
2.3. ESPECTROMETRIA ATOMICA .....	14
2.3.1. Espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) .....	16
2.4. MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA .....	17
2.4.1. Digestão assistida por microondas .....	18
2.4.2. Digestão por via seca .....	18
2.4.3. Digestão por via úmida.....	19
2.5. MÉTODOS ANALITICOS ALTERNATIVOS DE PREPARO DE AMOSTRA.....	20



2.5.1.	Processos oxidativos avançados (POAs).....	21
2.5.2.	Oxidação alcalina .....	21
2.5.3.	Extração assistida por ultrassom.....	22
2.6.	DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS ALIMENTARES EMPREGANDO A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E A TÉCNICA DE FAAS.....	26
2.7.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	26
2.7.1.	Linearidade e curvas analíticas.....	27
2.7.2.	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	28
2.7.3.	Precisão.....	29
2.7.4.	Exatidão .....	29
	CAPÍTULO 3: METODOLOGIA.....	31
3.1.	MATERIAIS E METODOS.....	31
3.1.1.	Amostragem .....	31
3.1.2.	Reagentes.....	32
3.1.3.	Equipamentos e parâmetros instrumentais .....	32
3.1.4.	Limpeza dos materiais .....	34
3.2.	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA O PREPARO DA AMOSTRA .	34
3.3.	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	35
3.4.	VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM COMO PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE Mn, Zn e Mg EM SEMENTES E FARINHAS DE CHIA POR FAAS .....	36
3.4.1.	Linearidade e curvas analíticas.....	37
3.4.2.	Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	37
3.4.3.	Precisão.....	37
3.4.4.	Exatidão.....	37
	CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1.	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM POR PLANEJAMENTO FATORIAL.....	38
4.2.	VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA A DETERMINAÇÃO DE Mn, Zn e Mg EM SEMENTES E FARINHAS DE CHIA .	45
4.2.1.	Linearidade e curvas analíticas.....	45
4.2.2.	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) .....	48
4.2.3.	Exatidão e Precisão.....	50
4.2.3.1.	Precisão.....	51
4.2.3.2.	Exatidão.....	52
5.	CONCLUSÕES .....	58
6.	REFERÊNCIAS. ....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação taxonômica da chia ( <i>Salvia hispanica</i> L.) .....	6
<b>Tabela 2.</b> Vitaminas na semente de chia.....	8
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos métodos de espectrometria atômica.....	15
<b>Tabela 4.</b> Informações relevantes das amostras de sementes e de farinhas de chia .....	32
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros operacionais empregados na determinação de Fe, Ca, Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia por FAAS.....	33
<b>Tabela 6.</b> Procedimentos de preparo de amostra adotados para a análise de Mn, Zn, Fe, Ca e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia. ....	35
<b>Tabela 7.</b> Fatores e níveis do planejamento fatorial $2^2$ para a determinação de íons metálicos em farinha de chia por FAAS.....	36
<b>Tabela 8.</b> Faixas lineares de Mn, Zn e Mg utilizadas para o estudo de linearidade. ....	37
<b>Tabela 9.</b> Teores de Fe, Mn, Zn, Mg e Ca em farinha de chia e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial $2^2$ . ....	38
<b>Tabela 10.</b> Efeitos médios calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial $2^2$ para os teores de Fe, Mn, Zn, Mg e Ca em farinha de chia.....	39
<b>Tabela 11.</b> Comparação entre a extração assistida por ultrassom com a digestão por via úmida para a determinação de Mn, Zn e Mg em farinha de chia .....	44
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros de calibração e linearidade.....	46
<b>Tabela 13.</b> Comparação dos limites de detecção e de quantificação da extração assistida por ultrassom com a digestão por via úmida para a determinação de Mn, Zn e Mg em farinha de chia .....	49
<b>Tabela 14.</b> Teores médios e respectivos desvios padrão de Mn, Zn e Mg nas amostras de sementes e farinhas de chia obtidos pelo emprego de métodos de preparação de amostras distintos (método de referência e extração assistida por ultrassom). ....	51
<b>Tabela 15.</b> Dados do estudo de precisão (teste- <i>F</i> e intervalos de confiança) do método de referência e a extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em farinhas e sementes de chia.....	52
<b>Tabela 16.</b> Resultados da avaliação da exatidão do método de extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e farinhas de chia.....	54
<b>Tabela 17.</b> Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em chia por FAAS. ....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Queimador de fluxo laminar empregado em espectroscopia de absorção atômica (Fonte: SKOOG et al., 2005). .....	16
Figura 2. Processo de produção de átomos, moléculas e íons da amostra na chama (Fonte: SKOOG et al., 2005).....	17
Figura 3. Representação da diminuição do tamanho de partícula de um sólido durante a ultrassonicação. A) Pequenas bolhas de gás na superfície do sólido; B) Fenômeno de cavitação de gás sobre a superfície do sólido; C) implosão das bolhas e divisão do sólido; D) Separação das novas partículas formadas (Fonte: LEITE, 2015).....	23
Figura 4. Representação dos ciclos de rarefação, compressão e implosão das bolhas de cavitação (FONTE: GEDANKEN, 2014). .....	24
Figura 5. a) Ultrassom tipo sonda com UP200Ht (Fonte: Hielscher ultrasonics technology, 2016), b) banho de ultrassom (Spencer, modelo CD 4800)(Fonte: Arquivo pessoal). 25	
Figura 6. Espectrômetro de absorção atômica em chama (Fonte: Arquivo pessoal) .....	33
Figura 7. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial para a extração assistida por ultrassom de a) Mn, b) Zn e c) Ca em farinha de chia.....	40
Figura 8. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial para a extração assistida por ultrassom de Mg em farinha de chia. ....	42
Figura 9. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial para a extração assistida por ultrassom de Fe de farinha de chia. ....	43
Figura 10. Curvas analíticas para a determinação de A) Mn, B) Zn e C) Mg por FAAS .....	47
Figura 11. Comparação por regressão linear dos métodos de preparo de amostra de digestão por via úmida e da extração assistida por ultrassom para Zn, Mn e Mg em amostras de sementes e farinhas de chia. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância sanitária
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>EAS</b>	Emission Atomic Spectrometry
<b>FAAS</b>	Flame Atomic Absorption Spectroscopy
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonisation
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
<b>POAs</b>	Processos Oxidativos Avançados
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>CV</b>	Coefficiente de Variação
<b><i>r</i></b>	Coefficiente de Correlação
<b><math>R^2</math></b>	Coefficiente de Determinação
<b>RSD</b>	Relative Standard Deviation
<b><math>F_{faj}</math></b>	Valores de $F$ para falta de ajuste
<b><math>F_{obs}</math></b>	Valores de $F$ observado
<b>IC</b>	Intervalos de confiança
<b>ICP-OES</b>	Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy

## **CAPITULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

### **1.1. INTRODUÇÃO**

Recentemente, há uma tendência mundial na busca de alimentos mais saudáveis. Dessa forma, alimentos da antiguidade têm sido redescobertos ou alimentos de outras culturas têm sido experimentados, como um dos caminhos para encontrar novos sabores, texturas e nutrientes. Dessa maneira, a ciência moderna concluiu que as dietas pré-colombianas eram superiores em seu valor nutricional e nutracêutico e esses alimentos são conhecidos atualmente como alimentos funcionais (GONZÁLEZ, 2014).

Os alimentos funcionais tem se destacado em todo o mundo nos últimos anos por causa da preocupação dos consumidores em adotar um estilo de vida saudável. Um motivo de preocupação é o crescente número de pessoas que sofrem de doenças cardiovasculares (DCV), pressão arterial alta, obesidade, diabetes e outras doenças relacionadas (NORLAILY et al., 2012). Portanto, verifica-se uma crescente tendência do mercado para o consumo de alimentos funcionais, como alimentos enriquecidos com fibras, óleos essenciais, vitaminas, minerais, antioxidantes como os carotenoides, flavonoides e antocianinas, que podem contribuir para a prevenção de doenças cardiovasculares, respiratórias e cancerígenas, entre outras (COATES, 2002).

O aumento do consumo de alimentos mais saudáveis e com propriedades funcionais no Brasil é uma prerrogativa para que efetivamente seja possível consolidar uma alimentação saudável e segura em várias regiões do país. O consumo da semente de chia tem despertado um interesse crescente devido aos inúmeros benefícios para a saúde que lhe são atribuídos, nomeadamente na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, e na prevenção do ganho de peso (FERREIRA, 2013; CALDEIRA e VILARDO 2015).

As sementes de chia apresentam constituintes importantes do ponto de vista nutricional como proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras dietéticas, minerais, vitaminas e matéria seca (SEGURA-CAMPOS et al., 2014). Além disso, a chia possui uma quantidade elevada de compostos antioxidantes (IXTAINA et al., 2011).

As sementes de chia, além de serem uma excelente fonte de ácidos graxos ômega-3, também se destacam em termos de minerais. Elas apresentam teores elevados

de elementos como cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e potássio (K), baixo teor de sódio (Na) e bons níveis de micronutrientes como ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e cobre (Cu) (BOLAÑOS, MARCHEVSKY E CAMIÑADE, 2015). É importante ressaltar que a diferença marcante entre a chia e outras fontes de ômega-3, é seu baixo teor de Na e por não conter glúten (BUSOLACCHI et al., 2013; FERREIRA, 2013; MOHD ALI et al., 2012; MOURÃO et al., 2014; MUÑOZ et al., 2013). Portanto, para as pessoas que sofrem de pressão arterial elevada ou são celíacas e precisam de uma dieta restrita em Na e glúten, o consumo da chia e os seus derivados poderiam ser vantajosos (BUSILACHI et al., 2013).

Apesar da chia ser reconhecida como uma fonte de minerais importantes do ponto de vista nutricional, na literatura métodos analíticos para sua determinação ainda são escassos. Até o momento foi encontrado somente um estudo que descreve a análise de minerais em sementes de chia e outros grãos por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), utilizando como método de preparo de amostra a digestão assistida por micro-ondas (BOLAÑOS, MARCHEVSKY e CAMIÑA, 2015). Em vista disso, torna-se muito importante o desenvolvimento de novos métodos analíticos para os processos de controle de qualidade a fim de monitorar a composição química de alimentos como a chia (NUNES et al., 2011; TAHAN et al., 1995).

A maioria dos métodos de preparação de amostras convencionais mencionados na literatura envolvem a solubilização da matriz orgânica, fazendo uso de ácidos com propriedades oxidantes e peróxido de hidrogênio a temperaturas elevadas em sistemas abertos ou fechados para posterior análise por técnicas de espectrometria de absorção e de emissão atômica (MATUSIEWICZ, 2003; MATUSIEWICZ e GOLIK, 2004). No entanto, muitos desses processos requerem equipamentos de laboratório complexos, e aumentam o risco de contaminação e perdas do analito por volatilização ou pela adsorção nos frascos de digestão (NUNES et al., 2011).

A preparação de amostras em alimentos é considerada como a etapa mais crítica e de maior custo do processo analítico (representando 61% do tempo total da análise e 30% do erro analítico) (BRANDÃO, 2010). Devido a estes inconvenientes novos métodos de preparo de amostra têm sido estudados como a extração assistida por ultrassom, a oxidação alcalina e os processos oxidativos avançados. A extração assistida por ultrassom se baseia na lixiviação de metais a partir de materiais em pó em suspensões contendo soluções ácidas diluídas (ALEIXO et al, 2004), em que as ondas

ultrassônicas promovem a extração do analito da matriz atuando na matéria orgânica presente na amostra, destruindo-a e provocando a liberação do metal de interesse (KORN et al.,2005; MORAES et al.,2009). A oxidação alcalina consiste na solubilização das amostras biológicas com o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) não exigindo o uso de energia, tais como micro-ondas nem aquecimento em placas (NUNES et al., 2011) e, os processos oxidativos avançados que são relativamente simples e eficientes, se baseiam na formação de radical hidroxila (HO•), agente altamente oxidante e reativo, que reage com uma grande variedade de classes de compostos, promovendo a decomposição destes (GROMBONI et al., 2007).

Apesar disso, ainda são escassos os estudos voltados à determinação de minerais nas sementes e farinha de chia. BOLAÑOS, MARCHEVSKY E CAMIÑADE (2015) reportam a utilização da digestão assistida por micro-ondas para determinar os teores dos minerais presentes em diferentes grãos, incluindo as sementes de chia por ICP OES.

Desta forma, com o intuito de minimizar os inconvenientes que apresentam os métodos tradicionais de preparo de amostra, torna-se interessante o desenvolvimento, a otimização e a validação de uma metodologia analítica alternativa de preparo de amostra que seja mais limpa e rápida do que os métodos convencionais para determinar Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia utilizando-se a Espectrometria de Absorção Atômica em chama (FAAS) e diferentes ferramentas quimiométricas.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo geral**

Otimizar e validar uma metodologia analítica de preparo de amostra rápida e que atenda aos princípios da Química Verde utilizando a extração assistida por ultrassom para a determinação de íons metálicos em chia por FAAS.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Otimizar a preparação da amostra pela extração assistida por ultrassom para a análise de íons metálicos em amostras de chia utilizando-se ensaios multivariados (planejamento de experimentos);
- ✓ Validar o método de FAAS otimizado para a determinação de íons metálicos em amostras de chia pelos parâmetros de linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão aplicando-se diferentes testes estatísticos (teste-*t*, ANOVA, teste-*F* e regressão linear);
- ✓ Determinar os teores dos íons metálicos em amostras de chia de diferentes procedências pelo método de FAAS validado;



## **CAPITULO 2 : FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. CHIA (SALVIA HISPANICA L.)**

A chia (*Salvia hispanica L.*) é uma planta herbácea anual de verão pertencente à família das Lamiáceas. No passado, foi um importante alimento para os astecas sendo cultivada em áreas montanhosas que se estendiam do centro do México até o norte da Guatemala (AYERZA e COATES, 2011; SILVA et al., 2012). Atualmente, é cultivada na Austrália, Bolívia, Colômbia, Guatemala, México, Peru, Argentina e Catamarca (BUSILACCHI et al., 2013). No Brasil, as regiões do oeste Paranaense e noroeste do Rio Grande do Sul começaram a investir no cultivo de chia nas últimas safras, apresentando bons resultados, apesar da falta de informação a respeito das exigências nutricionais da planta no Brasil (MIGLIAVACCA et al., 2014).

Em tempos pré-colombianos as sementes de chia eram consideradas um alimento sagrado para a população da América Central, tendo uma importância maior que o milho, o feijão e seus principais usos foram medicinais e alimentícios (BUSILACCHI et al., 2013; CEFLA, 2015). Tenochtitlan, a capital do império asteca, recebia anualmente grandes quantidades de sementes de chia, como tributo de nações conquistadas. Estas sementes eram também uma das oferendas aos deuses astecas. Com o declínio nas práticas religiosas, há cerca de 500 anos, o uso de sementes de chia foi quase extinto (AYERZA e COATES, 2004). A chia foi uma planta importante e suas sementes, farinha e óleo foram valorizados por seus usos medicinais, alimentícios, artísticos e religiosos, sendo uma das matérias-primas mais importantes até a conquista espanhola (HERNANDEZ e MIRANDA, 2008; CAHILL, 2004).

#### **2.1.1. Características físicas e classificação taxonômica da chia (*Salvia hispanica L.*)**

A planta *Salvia hispanica L.* é sensível à luz solar, sendo a produtora de pequenas sementes brancas e pretas que atingem a maturação essencialmente no outono (IXTAINA et al.; 2011; CAPITANI et al.; 2012; FERREIRA, 2013). Apesar de a planta produzir os dois tipos de sementes (brancas e pretas), a maioria da produção de chia conta uma baixa percentagem de sementes brancas. De um modo geral, a chia disponível comercialmente apresenta uma mistura das duas sementes (AYERZA e COATES, 2011; FERREIRA, 2013; IXTAINA et al.; 2011).

A cor das sementes varia de preto, cinza e preto manchado de branco, e a forma é oval com tamanho variando de 1 a 2 mm (CAHILL e PROVANCE, 2002;

NORLAILY et al.; 2012). A chia pode crescer até 2,0 m de altura e possui um rendimento médio de 250 gramas de sementes por pé, sendo a melhor época de produção entre outubro e novembro, onde há chuvas espaçadas e calor (COELHO E SALAS-MELLADO, 2014). A planta de chia é cultivada principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, situadas entre 0 a 2600 m de altitude, e tolera condições de salinidade e seca, entretanto não resiste a geadas (MIGLIAVACCA et al., 2014).

A chia é uma planta herbácea cuja classificação taxonômica é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação taxonômica da chia (*Salvia hispanica* L.)

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordem</b>	Lamiales
<b>Família</b>	Lamiaceae
<b>Gênero</b>	Salvia
<b>Espécie</b>	S. hispanica

(Fonte: MUÑOZ et al., 2013; CEFLA, 2015).

### 2.1.2. Composição química e nutricional

As sementes de chia apresentam constituintes importantes do ponto de vista nutricional como proteínas (15-25%), lipídeos (30-33%), carboidratos (26-41%), fibras dietéticas (18-30%), minerais, vitaminas e matéria seca (90-93%) (SEGURA-CAMPOS et al., 2014; NORLAILY et al., 2012).

### 2.1.3. Antioxidantes

A chia possui uma quantidade elevada de compostos antioxidantes naturais como tocoferóis e polifenóis, sendo os principais compostos fenólicos o ácido clorogênico, o ácido caféico, a quercetina e o kaempferol (TAGA et al., 1984; IXTAINA et al, 2011; REYES-CAUDILLO et al., 2008). A grande quantidade de antioxidantes que a chia contém ajudam a reduzir os radicais livres que podem

ocasionar oxidações indesejáveis. Estudos recentes demonstram que os radicais livres ocasionam danos ao DNA, nos lipídeos, nas proteínas e em outras moléculas, implicando no desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (MUÑOZ et al., 2013; DI SAPIO et al., 2010). A chia tem um grande potencial alimentício, dado que a sua oxidação é mínima, comparada com outras fontes de ômega-3 como a linhaça, que apresenta uma decomposição rápida devido à ausência de antioxidantes (TOSCO, 2004).

#### **2.1.4. Ácidos graxos ômega-3**

A semente de chia contém de 25% a 40% de óleo. Desta porcentagem 60% corresponde a (ômega)  $\omega$ -3 ácido alfa-linolênico e 20% a (ômega)  $\omega$ -6 ácido linoléico (NORLAILY et al., 2012). O óleo de chia concentra a maior porcentagem conhecida de ácido graxo  $\alpha$ -linolênico, até 68% (AYERZA, 1995) comparado com 36% da camelina (*Camelina sativa L.*), 53% da perilla (*Perilla frutescens L.*) e 57% da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) (SULTANA, 1996; GUIOTO et al., 2013; SEGURA-CAMPO et al., 2014; AYERZA e COATES 2011). Os ácidos graxos ômega-3 são essenciais na dieta humana e necessitam ser consumidos já que o corpo não é capaz de sintetizá-los. É por isso que a chia torna-se um alimento muito atraente já que é uma das fontes naturais mais importantes de ácidos graxos.

Os ácidos graxos da família ômega 3 (EPA: (eicosapentaenóico, C20:5) e DHA (docosahexaenóico, C22:6)) após de ser consumidos são sintetizados pelos seres humanos a partir do ácido linolênico. Este ácido graxo é também o precursor primordial das prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos com atividade antiinflamatória, anticoagulante, vasodilatadora e antiagregante (RODRIGUES et al., 2003; PIMENTEL et al., 2005; MORAES e COLLA 2006). A partir da ingestão do ácido graxo ômega-3 ocorre a biossíntese no organismo dos ácidos graxos EPA que se relaciona com inúmeras funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e patológicos no organismo, além da proteção da saúde cardiovascular em adultos. Além disso, o ácido graxo DHA tem importante função na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina, sendo predominante na maioria das membranas celulares desses órgãos (MARTIN et al., 2006; COELHO et al., 2014). Além de seu papel nutricional na dieta, os ácidos graxos ômega-3 podem ajudar a prevenir ou tratar uma variedade de doenças, incluindo doenças do coração, câncer, artrite, depressão, mal de Alzheimer, entre outras (MORAES e COLLA, 2006; COELHO et al., 2014).

### 2.1.5. Proteínas

O percentual de proteínas da semente de chia (15-25%), semelhante ao da lentilha (23%), ervilha (25%) e grão de bico (21%) (OLIVOS-LUGO et al., 2010; IXTAINA et al., 2008), é indicativo para a sua utilização como fonte de nutrientes para animais e seres humanos, já que a semente contém todos os aminoácidos essenciais necessários para a nutrição humana (RUPFLIN, 2011; COELHO e SALAS-MELLADO 2014).

### 2.1.6. Vitaminas

A semente de chia também é uma boa fonte de vitaminas (Tabela 2). Ela apresenta elevados conteúdos de Vitamina A e bons níveis de vitamina B e C. A vitamina A (retinol) é nutriente essencial, necessário em pequenas quantidades em humanos para o adequado funcionamento do sistema visual, crescimento e desenvolvimento, função imune e de reprodução (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2007). A vitamina A é a mais estudada das vitaminas, já que sua deficiência prolongada causa hipovitaminose A que se não é tratada a tempo, acarreta uma síndrome ocular, a xeroftalmia, a qual poderá conduzir a um quadro de cegueira irreversível (RONCADA et al., 1978; SOUZA e VILAS BOAS, 2002).

**Tabela 2.** Vitaminas na semente de chia

Vitaminas	Quantidade (mg/100g)
Vitamina A	44,0
Vitamina C	< 30,0
Vitamina E	0,74
Tiamina	0,18
Vitamina B2	0,04
Vitamina B3	6,13
Vitamina B6	0,10

(Fonte: Bresson et al., 2009; CEFLA, 2015)

### **2.1.7. Composição mineral da chia**

A chia além, de ser uma excelente fonte de ácidos graxos, também se destaca em termos de minerais. Ela apresenta teores elevados de elementos como Ca ( $6240,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ), P ( $7992,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Mg ( $3694,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e K ( $6658,3 \mu\text{g g}^{-1}$ ), baixo teor de Na ( $10,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e bons níveis de micronutrientes como Fe ( $243,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Zn ( $69,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Mn ( $30,3 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e Cu ( $22,7 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (BOLAÑOS, MARCHEVSKY e CAMIÑADE, 2015).

Estas características nutricionais e químicas têm despertado o interesse comercial pela chia (*Salvia hispânica* L), sendo esta planta introduzida em vários países como um cultivo promissor (COATES e AYERZA, 1996). Em virtude disso, diferentes produtos alimentícios e medicinais têm sido preparados e industrializados a partir das sementes de chia (HERNÁNDEZ e MIRANDA, 2008).

## **2.2. MINERAIS E SUA IMPORTÂNCIA NO ORGANISMO**

Os nutrientes usados na alimentação humana são classificados como macronutrientes (quantidade  $> 100 \text{ mg/dia}$ ) e micronutrientes (quantidade  $< 100 \text{ mg/dia}$ ). Os macronutrientes são macromoléculas que podem ser digeridas, absorvidas e utilizadas como fontes de energia e como substrato para a síntese de carboidratos, gorduras e proteínas necessárias para manter a integridade celular do metabolismo (GALLAGHER, 2013). Os micronutrientes também são nutrientes necessários para manter a integridade celular no metabolismo; no entanto, ao contrário dos macronutrientes, os micronutrientes são requeridos em pequenas quantidades (na ordem de miligramas a microgramas) na dieta diária (TOGNON, 2012; GALLAGHER, 2013).

Os minerais juntamente com as vitaminas pertencem ao grupo dos micronutrientes já que as quantidades que são necessárias na dieta são muito pequenas e como o corpo não pode sintetizá-los tem que ser consumidos pelo ser humano e animais. Os minerais são um grupo de compostos químicos de natureza inorgânica que são essenciais na dieta (RODRIGUEZ e MAGRO, 2008). Eles participam de diversos processos metabólicos do organismo, como por exemplo, na ativação enzimática, no equilíbrio hídrico, na contração muscular, na produção de hemoglobina, no fortalecimento do sistema imunológico, no balanço ácido-base e a pressão osmótica, entre outros (BRASIL, 2008; GROMBONI et al., 2010).

Os minerais são essenciais para uma ampla gama de funções metabólicas no organismo humano; as deficiências minerais podem causar danos graves para a saúde, e é por isto que os alimentos desempenham um papel chave ao fornecer esses nutrientes para os seres humanos (KASTENMAYER, 2007). Portanto, o conhecimento do conteúdo mineral nos alimentos e bebidas é importante já que eles são essenciais para a nutrição humana, mas podem causar toxicidade se não se tem uma ingestão adequada deles (ONIANWA et al., 2001; NASCENTES et al., 2004; BRANDÃO et al., 2012).

O corpo humano tem um sistema muito eficaz para controlar a absorção de alguns minerais. Em estados de deficiência, o corpo absorve a maioria dos minerais do alimento através do intestino e reduz a excreção através da urina. Se houver um excesso ocorre exatamente o oposto, isto é, absorve menos e excreta mais. Entretanto, o corpo tem uma capacidade limitada para excretar certos minerais, de modo que o consumo excessivo pode causar determinados problemas de saúde, mesmo em doses relativamente pequenas (WILLIAMS, 2002).

De acordo com os fatos mencionados acima na seção seguinte far-se-á uma discussão mais detalhada dos macro e microminerais investigados neste estudo: cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) dando-se destaque nas funções destes elementos no organismo e na ingestão diária recomendada.

### **2.2.1. Magnésio**

O magnésio (Mg) é o segundo cátion intracelular mais abundante e está envolvido em diversas e importantes reações bioquímicas (CUNHA, 2011; BARBAGALLO et al., 2010). O papel fisiológico do magnésio é importante, pois intervém para regular a atividade de mais de 300 reações enzimáticas; intervém, igualmente, na duplicação dos ácidos nucleicos, na excitabilidade neural e na transmissão de influxo nervoso (BRASIL, 2008). A recomendação dietética segundo a ANVISA para o magnésio é de 260 mg/dia (BRASIL, 2005b). No entanto, a ingestão deste macromineral está bem abaixo desta recomendação e a grande prevalência desta deficiência vem sendo associada a diversas doenças crônicas como estresse oxidativo, estado pró-inflamatório, disfunção endotelial, agregação plaquetária, resistência à insulina e hiperglicemia (CUNHA et al., 2011).

O magnésio encontra-se na maioria dos alimentos, porém, em concentrações variadas. São considerados alimentos com altas concentrações os vegetais escuros folhosos, sementes oleaginosas, cereais integrais, frutas e legumes (CHACKO et al., 2010). Além disso, os frutos do mar e os produtos lácteos também apresentam quantidades significativas de Mg em sua composição (SAMPAIO et al., 2015)

### **2.2.2. Cálcio**

O cálcio (Ca) é um nutriente essencial necessário em diversas funções biológicas tais como: constituinte de fluidos e tecidos, regulação cardíaca, estimulante da secreção hormonal, contração muscular, coagulação sanguínea e a mais importante, a manutenção da estrutura e qualidade da massa óssea (GARCIA et al., 2011). Estudos tem demonstrado a associação entre o baixo consumo de cálcio e doenças crônicas, entre elas osteoporose, câncer de colón, hipertensão arterial e obesidade. Entretanto, grande parte da população brasileira apresenta consumo de cálcio abaixo do recomendado (PEREIRA et al., 2009). É por isso que diferentes empresas farmacêuticas produzem suplementos de cálcio para suprir as exigências diárias. Porém, estes suplementos são comercializados em apresentações grandes e difíceis de engolir, além de causarem com frequência efeitos secundários como náuseas, constipação e indigestão (GARCIA et al., 2011). Devido a isto, se torna indispensável o conhecimento de alimentos naturais que possam ser uma fonte importante de cálcio. Exemplos de fontes de cálcio são os produtos lácteos, sardinhas, espinafre, feijão, laranja lima, e bebidas à base de soja (PEREIRA et al., 2009).

No entanto, é importante ressaltar que uma ingestão muito alta de cálcio (isto é, 2000 mg ou mais por dia), especialmente em uma pessoa com um alto nível de vitamina D, é uma causa potencial de hipercalcemia; este distúrbio pode levar à calcificação excessiva em tecidos moles, especialmente os rins (TOGNON, 2012). A ingestão diária recomendada pela ANVISA em um adulto é de 1000 mg/dia (BRASIL, 2005b). A ingestão de cálcio (na forma catiônica,  $\text{Ca}^{2+}$ ) acima do limite recomendado pode interferir na absorção de outros cátions divalentes como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (WOOD e ZHENG, 1997).

### **2.2.3. Ferro**

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial que intervém em numerosos processos bioquímicos e fisiológicos. Nos alimentos, o ferro encontra-se formando parte de dois grupos diferentes, um de ferro hémico e outro de ferro não hémico (DALLMAN, 1990). O ferro tipo hémico, é o que forma parte da hemoglobina, mioglobina e outras hemoproteínas, sendo encontrado principalmente nos alimentos de origem animal. O ferro tipo não hémico é aquele ferro que não se encontra unido ao grupo heme; basicamente está formado por sais inorgânicos deste metal e encontra-se principalmente nos alimentos de origem vegetal, além dos preparados farmacêuticos utilizados na terapia contra a deficiência deste mineral (DALLMAN, 1990; HARDMAN e LIMBIRD, 2001; BOCCIO et al., 2003). A carência de ferro pode ser devida a perdas excessivas (hemorragias digestivas, hemorroidas, ulcerações digestivas, hipermenorréias), a má absorção ou, ainda, à dieta diária insuficiente, causada por alimentação composta de gorduras, farinhas brancas e açúcar refinado, todos pobres em ferro (BRASIL, 2008). Além disso, estudos revelam que alimentos com alto teor de fitatos e ricos em compostos fenólicos podem inibir a absorção de Fe pelo organismo, devido à formação de complexos insolúveis que tornam este elemento menos disponível (FAIRWEATHER-TAIT e HURRELL, 1996).

O Fe pode ser encontrado em alimentos ricos nesse micromineral, em alimentos fortificados e em alimentos contaminados com o elemento. No caso dos alimentos ricos em ferro, destacam-se as carnes que possuem ferro de alta biodisponibilidade (cerca de 40% na forma heme), cujas taxas de absorção variam entre 10 e 12% para carne de aves e peixes e 20% e 24% para carne bovina (LARISSE et al., 1968; HAZELL, 1985; ALMEIDA e NAVEZ, 2002). Vale acrescentar que qualquer tipo de carne (tecido muscular), incluindo aqueles de mais baixo custo, possui ferro de alta biodisponibilidade (ALMEIDA e NAVES, 2002). A ingestão recomendada para o Fe é de 14 mg/dia em adultos segundo a ANVISA (BRASIL, 2005b).

### **2.2.4. Manganês**

Para os seres humanos o Mn é um metal traço essencial e, em doses muito altas, um metal tóxico (BORNHORST et al., 2010). Ele é encontrado em todos os tecidos, e é necessário para o normal funcionamento dos aminoácidos, lipídios, proteínas e o



metabolismo dos carboidratos (ASCHNER e ASCHNER, 2005; ERICKSON et al., 2007.; GUPTA e GUPTA, 2014) tendo papel importante em todos os organismos animais e vegetais. Nestes, ele participa das enzimas fosfotransferases (que atuam no crescimento das plantas) e no processo de fotossíntese (etapa de foto-oxidação da água, com liberação de O<sub>2</sub> pelos cloroplastos). O Mn é o terceiro metal de transição mais importante em nossa dieta (após Fe e Zn) (AZEVEDO e AFONSO, 2012). Além disto, este elemento funciona como um antioxidante e é importante na formação dos ossos, no metabolismo de gorduras, na regulação do açúcar no sangue e na absorção de Ca (BRASIL, 2008; ANDOLFATO, 2016). Devido a presença do Mn nos produtos alimentícios, a absorção deste elemento da dieta diária nos países industrializados é maior em comparação com a exigência diária estimada. Portanto, a deficiência de Mn é extremamente rara. No BRASIL a ANVISA estabelece 2,3 mg/dia para adultos (BRASIL, 2005b). Os alimentos que aportam Mn são os cereais integrais, nozes, leguminosas, abacaxi e chás (BRASIL, 2008).

A toxicidade crônica por Mn é mais prevalente e afeta principalmente o sistema nervoso central (BORNHORST et al., 2010; GUPTA e GUPTA, 2010). A exposição a quantidades excessivas de Mn está associada a uma variedade de perturbações psiquiátricas e motoras (CALNE et al., 1994; PAL et al., 1999; STREDRICK et al., 2004; ASCHER et al., 2007).

### **2.2.5. Zinco**

O zinco (Zn) é considerado um elemento traço essencial em todos os sistemas vivos, desempenhando um papel importante nas atividades enzimáticas, metabolismo dos ácidos nucleicos, síntese de proteínas, manutenção da estrutura e função das membranas, atividade hormonal, reprodução e maturidade sexual (TRINDADE et al., 2012). É um mineral que se encontra amplamente distribuído em todo o corpo humano, porém em pequenas concentrações (1,5g a 2,5g) (FERNANDES e FREIRE, 2011; HAMBIDGE et al., 2008) e o organismo aproveita apenas 5% a 10% do zinco contido na alimentação. Estudos recentes concluíram que a carência de zinco produz modificações importantes no metabolismo dos ácidos graxos e pode constituir-se em um fator de risco à arteriosclerose. Na alimentação humana, a forma mais prontamente disponível de zinco é a encontrada em carne bovina, peixes, aves, leite, nozes, mariscos, fígado, cereais de grãos integrais. Normalmente, a ingestão de zinco correlaciona-se

com a ingestão de proteínas (TOGNON, 2012; BRASIL, 2008). A recomendação diária de ingestão de zinco segundo a ANVISA é de 7,0 mg/dia em adultos (BRASIL, 2005b). No entanto, em algumas fases da vida, as necessidades deste mineral estão aumentadas, como na gestação, infância, puberdade e senilidade (HAMBIDGE et al., 2008; FERNANDES e FREIRE, 2011).

Apesar de conhecer-se a importância dos alimentos na nutrição humana e as funções dos minerais no organismo, ainda são escassos os estudos voltados à determinação dos minerais em alimentos, e por isso torna-se importante monitorar os níveis dos metais essenciais, principalmente daqueles alimentos que estão sendo redescobertos ou que são poucos conhecidos, mas que são consumidos como a chia (*Salvia hispanica L.*). Para esta finalidade, vários métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos e aplicados na determinação de metais em alimentos, sendo os mais comumente usados: espectrometria, fluorimetria, espectrometria de absorção atômica (AAS), electroanalíticos, cromatográficos, entre outros (KASTENMAYER, 2007; MONTEIRO et al., 2014).

### **2.3. ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

A espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês Atomic Absorption Spectrometry) é uma das técnicas mais bem estabelecidas no campo da análise instrumental e é amplamente utilizada para análise da composição mineral em uma diversidade de matrizes (biológicas, ambientais, geológicas e de alimentos), sendo consideradas técnicas analíticas bem sucedidas (BRANDÃO, 2012). Os métodos de espectrometria atômica são utilizados na determinação qualitativa e quantitativa de mais de 70 elementos, permitindo a detecção de partes por milhão (ppm) ou por bilhão (ppb) e às vezes até concentrações menores (SKOOG et al., 2005; HARRIS, 2007; COI, 2008).

O estudo espectrométrico das espécies atômicas só é possível se estas estiverem no estado gasoso, onde os átomos ou íons se encontram bem separados uns dos outros. Conseqüentemente, o primeiro passo dos procedimentos de espectrometria atômica é a atomização, processo em que uma amostra se volatiliza e decompõe-se em átomos e íons em fase gasosa (SKOOG et al., 2005; GRILO, 2009). Uma vez convertida a

amostra para o estado gasoso ou íons elementares são diversos os tipos de espectros que podem se utilizar. Na tabela 3 são apresentadas as diferentes técnicas espectrométricas e os tipos de espectros utilizados por estas.

**Tabela 3.** Classificação dos métodos de espectrometria atômica

<i>Método de atomização</i>	<i>Temperaturas de atomização (°C)</i>	<i>Tipos de espectroscopia</i>	<i>Nome comum e sigla</i>
Plasma acoplado indutivamente	6000-8000	Emissão	Espectrometria de emissão em plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)
		Massa	Espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)
Chama	1700-3150	Absorção	Espectrometria de absorção atômica (AAS)
		Emissão	Espectrometria de emissão atômica (AES)
Eletrotérmico	1200-3000	Fluorescência	Espectrometria de fluorescência atômica
		Absorção	AAS eletrotérmica
Plasma de corrente contínua	5000-10000	Fluorescência	(AFS) eletrotérmica
		Emissão	Espectroscopia de plasma de corrente contínua DC, DCP.

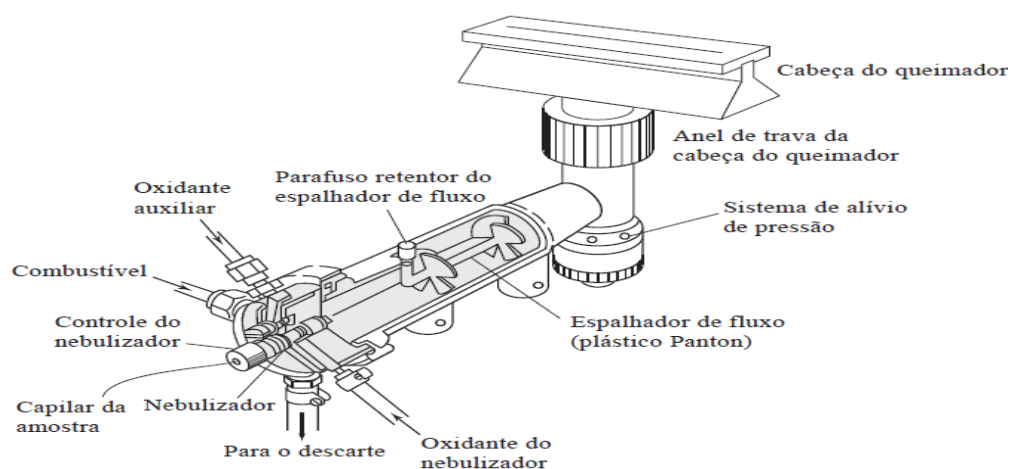
(Fonte: SKOOG et al., 2005)

A AAS parece ser à primeira vista, uma técnica bastante simples se comparada com outras técnicas de espectrometria atômica. Ainda hoje, é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de baixas concentrações de elementos (RIBEIRO et al., 2001). As duas principais modalidades usadas na análise elementar são a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS do inglês Flame Atomic Absorption Spectroscopy) e a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GF AAS do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry). Essas duas técnicas diferem basicamente nas instrumentações utilizadas (tipos de equipamento) e nos limites de detecção e ambas se baseiam na quantidade de energia luminosa absorvida pelos átomos neutros no estado fundamental do elemento de

interesse (MILLIKAN, 2012; TOGNON, 2012; CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000; ANDOLFATTO, 2016).

### 2.3.1. Espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)

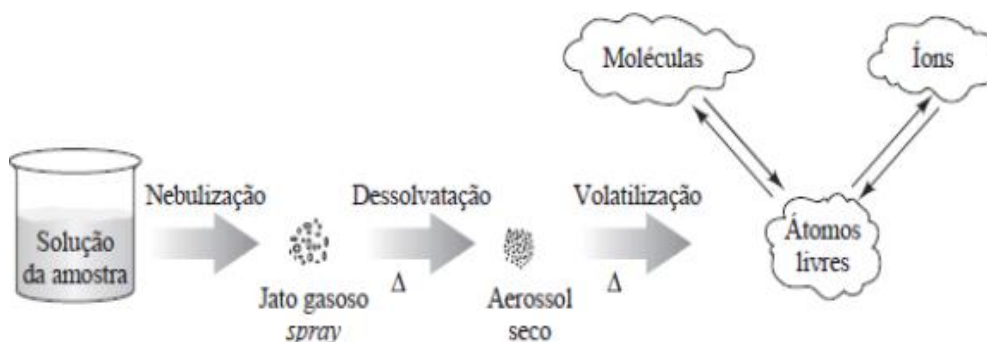
A Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) é a técnica mais antiga dentre as técnicas de AAS, tendo seu desenvolvimento em 1955, por Sir Allan Wash, e sua disponibilização comercial a partir de 1962. Nesta técnica a solução de amostra é aspirada para o interior de um sistema **nebulizador/queimador** (Figura 1) e transportada por gases até uma chama que é usualmente constituída de ar-acetileno ou óxido nitroso-acetileno (dependendo do elemento de interesse), onde ocorre a atomização dos elementos. Uma vez atomizados, estes átomos livres serão capazes de absorver energia eletromagnética de uma fonte de radiação externa, sendo que a quantidade de energia absorvida será proporcional à população de átomos na chama (SKOOG et al., 2005; BROEKAERT, 2001; PERONICO, 2014).



**Figura 1.** Queimador de fluxo laminar empregado em espectroscopia de absorção atômica (Fonte: SKOOG et al., 2005).

Usualmente, os nebulizadores mais empregados são aqueles que contam com uma câmara de pré-mistura, em que o aerossol é misturado com o gás comburente e oxidante antes de atingir o queimador. A amostra sem material particulado em suspensão (não necessariamente aquosa) é aspirada por um tubo capilar para dentro de um nebulizador pneumático, ocorrendo assim, o processo de atomização do líquido

dispersando-o como uma fina névoa assim que deixa o capilar. A névoa é direcionada em alta velocidade sobre uma pérola de vidro, na qual as gotículas se dispersam em partículas ainda menores. A formação de pequenas gotículas é chamada de nebulização (Figura 2). Forma-se, então, um aerossol, isto é, finas partículas líquidas dispersas em um gás. Desse modo, o nebulizador produz um aerossol a partir da amostra líquida. O líquido inicialmente aspirado que não consegue entrar na chama é coletado no fundo da câmara de nebulização e é eliminado por meio de um dreno. Esse processo apresenta pouca eficiência e cerca de 5 a 10% apenas da solução inicialmente aspirada consegue atingir a chama (VANDECASTEELE, 1997; COL, 2008; SKOOG et al., 2008; TOGNON, 2012; ALEIXO et al., 2004).



**Figura 2.** Processo de produção de átomos, moléculas e íons da amostra na chama (Fonte: SKOOG et al., 2005).

Por outro lado, a técnica de FAAS é utilizada para a quantificação de íons metálicos em alimentos. No entanto, este tipo de matriz possui um elevado conteúdo de matéria orgânica que pode causar problemas relacionados com o transporte da amostra, tais como na aspiração e nebulização, devido à sua elevada viscosidade, flutuações da chama e acumulação de depósitos sólidos na cabeça do queimador, devido ao alto teor de sólidos solúveis (BRANDÃO et al., 2012). Para evitar isso é necessário executar uma etapa prévia de mineralização, com o objetivo de eliminar a matéria orgânica, ou seja, destruir a matéria orgânica presente na matriz de forma que o analito de interesse possa ficar livre na solução para ser quantificado (TREJOS, 2012; SOLA-LARRAÑAGA e NAVARRO-BLASCO, 2009).

#### 2.4. MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA

Tradicionalmente, a maioria dos métodos de preparo de amostra utilizadas na determinação de metais em amostras de alimentos se baseiam na mineralização da

matéria orgânica utilizando os métodos de digestão por via úmida, digestão por via seca (calcinação) ou pela digestão assistida por micro-ondas (KRUG, 2006; TREJOS, 2012; POHL, 2009; KASTENMAYER, 2007). Porém, estes processos de abertura da amostra são tediosos, requerem equipamentos laboratoriais complexos, aumentam o risco de contaminação por manipulação da amostra e apresentam perdas de analito por volatilização (WELNA et al., 2011; NUNES et al., 2011; SILVA et al., 2012; NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; POHL, 2009; ANDRADE et al., 2014; SZYMCZYCHA-MADEJA, WELNA e POHL, 2014).

#### **2.4.1. Digestão assistida por micro-ondas**

No final da década de 70, a utilização da radiação micro-ondas (MW) foi proposta como uma estratégia analítica para a decomposição de amostra e, gradualmente, está se tornando uma ferramenta comum no preparo de amostra (OLIVEIRA, 2003). A utilização de frascos resistentes à alta pressão e ácidos oxidantes concentrados proporciona excelentes e rápidas decomposições (CARVALHO et al., 2005). No entanto, o procedimento de digestão por micro-ondas necessita de temperaturas e pressões elevadas, gerando elevados custos, além de risco para os analistas, tornando-se muitas vezes economicamente não atraente já que o equipamento é caro e muitas vezes inviável para a análise de rotina (NASCENTE, KORN e ARRUDA, 2001; KRUG, 2006; FREITAS et al., 2015).

#### **2.4.2. Digestão por via seca**

A digestão por via seca, também denominada decomposição por combustão é utilizada em procedimentos de preparo de amostra para a determinação da composição mineral em amostras orgânicas. Este processo se baseia na oxidação da matéria orgânica em atmosfera de ar ou oxigênio em altas temperaturas, resultando em um resíduo inorgânico não volátil e solúvel em água ou ácidos diluídos (HOENIG, 2001; SKOOG et al., 2005; FLORES et al., 2007; KORN, 2010; PERONICO, 2014).

Um dos procedimentos mais utilizados consiste em colocar a amostra em um cadinho (quartzo, porcelana, etc.) e aquecê-la em atmosfera ambiente, até que todo o material orgânico seja carbonizado, resultando em um resíduo orgânico não volátil. O procedimento de decomposição deve ser conduzido em um forno tipo mufla ajustando-

se a temperatura a um valor suficientemente alto para decompor a amostra em um tempo razoável, sem que ocorra perdas do analito na forma de espécies inorgânicas voláteis. Essas perdas por volatilização tornam-se mais severas quanto mais alta for a temperatura usada para a decomposição. Entretanto, se não for usada uma temperatura suficientemente alta, a amostra não será decomposta por completo, dando origem a resultados não exatos (KRUG, 2006).

As temperaturas utilizadas costumam ser entre 450 a 550 °C a pressão atmosférica, sendo determinantes no caso em que os elementos de interesse são voláteis. Para acelerar o processo de decomposição ou mesmo evitar que perdas por volatilização ocorram, podem ser empregados agentes oxidantes como nitrato e óxido de magnésio. Assim, as cinzas resultantes podem ser dissolvidas em ácidos adequados e as análises podem ser desenvolvidas (HOENIG, 2001; KORN et al., 2008; COL, 2008).

#### **2.4.3. Digestão por via úmida**

A decomposição por via úmida com ácidos oxidantes é a mais comum dos procedimentos de preparo de amostra (MATUSIEWICZ, 2003). Normalmente, os procedimentos são realizados em frascos abertos, aquecidos em chapa de aquecimento ou blocos digestores, que são frascos fechados de alta pressão. A digestão ocorre a partir do aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado individualmente ou combinado com outros ácidos ou, também com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Os ácidos mais usados neste método de preparo de amostra são: ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido nítrico ( $HNO_3$ ), ácido fluorídrico (HF), entre outros. Se os ácidos utilizados forem suficientemente oxidantes e se o aquecimento for feito a temperaturas elevadas durante um período de tempo adequado torna-se possível oxidar completamente a maioria das amostras a partir desse método de digestão. Convencionalmente, quando se obtém uma solução clara e descolorida, ou uma total recuperação de alguns elementos tem sido tacitamente assumido que a oxidação da matéria orgânica foi completa, para fins práticos. Entretanto, tais suposições não são necessariamente verdadeiras para todos os casos (FLORES et al., 2006).

Em geral, os sistemas abertos são atualmente mais susceptíveis a erros sistemáticos. No entanto, as perdas dependem da fonte de calor utilizada e do tipo de evaporação (se é parcial ou total) (LINK e KINGSTON, 2000; FLORES et al., 2007).

No caso de sistemas abertos, o ponto de ebulição do ácido determina a temperatura máxima de decomposição (KORN et al., 2008; COL, 2008). É por isso que baixas temperaturas de digestão com ácido nítrico a pressão ambiente e, por conseguinte, a inadequada capacidade de oxidação são as razões para a utilização de outros ácidos ou misturas de ácidos (FLORES et al., 2007; OZKAN e AKMAN, 2000). O emprego de combinações de ácidos é sempre avaliado, pois potencializa os processos de digestão por via úmida, pois é possível combinar diferentes propriedades químicas ou produtos com maior reatividade que reagentes empregados separadamente (KRUG, 2006; PERONICO, 2014).

Outro aspecto que possui elevada relevância nos procedimentos de tratamento de amostras por via úmida é a forma de energia empregada no sistema, uma vez que esta pode influenciar diretamente no tempo requerido para completar a decomposição do material e na quantidade de reagentes utilizados (KRUG, 2006; OLIVEIRA, 2014). Procedimentos de decomposição como a via úmida em sistemas abertos que utilizam energia térmica requerem muito tempo para converter a amostra sólida em uma solução e podem necessitar de constante supervisão. Além disso, consomem maior quantidade de reagentes e estão sujeitos a contaminações do meio externo e, principalmente, podem apresentar perdas dos analitos por volatilização (OLIVEIRA, 2003; PERONICO, 2014).

## **2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS DE PREPARO DE AMOSTRA**

Diversos procedimentos têm sido estabelecidos com o intuito de minimizar, ou até mesmo, evitar o processo de preparação de amostra, tendo em vista as dificuldades que são encontradas durante esta etapa do processo analítico com os métodos convencionais. Neste sentido, existe uma constante busca pelo desenvolvimento de metodologias de preparação de amostra que apresentem simplicidade, rapidez, utilizem pequenos volumes de reagentes, permitam o tratamento de um grande número de amostras, além de proporcionar resultados precisos e exatos (FERREIRA et al., 2010; BRANDAO, 2010). Recentemente, novas alternativas para melhorar o preparo de amostra têm sido exploradas como os processos oxidativos avançados (POAs), a oxidação alcalina e a extração assistida por ultrassom.



### **2.5.1. Processos oxidativos avançados (POAs)**

Os processos oxidativos avançados (ou processos avançados de oxidação), conhecidos pela sigla POA's, são processos que se baseiam na geração de radicais livres, principalmente o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) que possui alto poder oxidante e pode promover a degradação de vários compostos principalmente orgânicos (FIOREZE, SANTOS e SCHMACHTENBERG, 2014; NOGUEIRA et al., 2007). Esses radicais são capazes de oxidar a maioria dos compostos orgânicos em dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), água e íons inorgânicos, através de reações de degradação (FERREIRA, 2016; GROMBONI et al., 2010; GROMBONI et al., 2007; PAPADOPOULOS, FATTA e LOIZIDOU, 2007). Os POAs, como método de preparo de amostra, apresentam algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais como menor consumo de energia, baixas concentrações de reagentes e baixa temperaturas (TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

### **2.5.2. Oxidação alcalina**

Uma abordagem alternativa para a preparação de amostras de materiais biológicos é a oxidação alcalina, que faz uso de reagentes alcalinos fortes, solúveis em água ou em álcoois como o reagente hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para solubilizar a matéria orgânica (KORN et al., 2008; NÓBREGA et al., 2006; SILVA et al., 2012). Este reagente é uma base orgânica forte (pH entre 13,4 a 14,7) com a fórmula química  $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ , com propriedade de solubilizar diferentes tipos de tecidos, estabilizando os elementos voláteis na suspensão durante meses a temperatura ambiente (TAO et al., 1999; NÓBREGA et al., 2006; NUNES et al., 2011).

A solubilização com este reagente oferece uma abordagem rápida e simples para a obtenção de uma solução de amostra homogeneizada, que é uma vantagem distinta em relação aos métodos convencionais de preparação de amostra. Além disso, uma vez que não é necessário aquecimento ou apenas um leve aquecimento, perdas de analitos voláteis são minimizadas. Outra consequência da pequena quantidade de TMAH usada é a realização do preparo de amostra com menor manipulação e por isso baixos valores para os brancos podem ser obtidos, melhorando o limite de detecção da substância a ser analisada e, portanto, a sensibilidade do método (MATUSIEWICZ e GOLIK, 2004).

### 2.5.3. Extração assistida por ultrassom

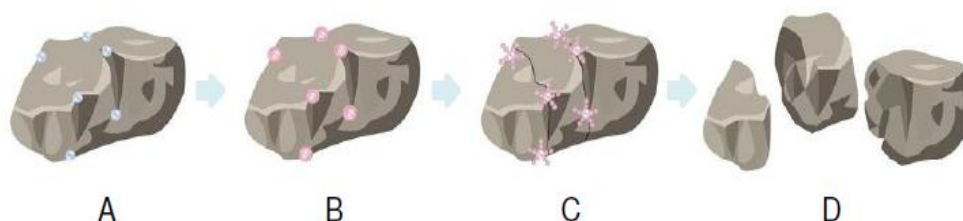
A extração assistida por ultrassom foi recentemente proposta como uma metodologia alternativa aos métodos tradicionais de pré-tratamento de amostra (digestão por via úmida e digestão por via seca), e é atualmente um procedimento de muito interesse (ASHLEY et al., 2001; FILGUEIRAS et al., 2000; PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2007; DE LA CALLE et al., 2009) pois, acelera e simplifica o tratamento de amostras apresentando mínima contaminação, baixo consumo de reagentes, e geração de um resíduo mínimo da extração com relação aos métodos tradicionais (PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2007; ASHLEY et al., 2001; KAZI et al., 2006).

Nos últimos anos foram publicados diferentes trabalhos que fazem uso da extração assistida por ultrassom para a determinação de metais em diferentes amostras, por exemplo, em tecidos vegetais (FILGUEIRA, et al., 2000; DE LA CALLE et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; FERNANDES-COSTAS et al., 2006; MADURO et al., 2006), tecido animal (LAVILLA et al., 2006; MANUTSEWEE et al., 2007; ARAIN et al., 2007; REYES et al., 2008), tecidos humanos (KAZI et al., 2006; YEBRA-BIURRUN e CANCELA-PEREZ, 2007; YEBRA-BIURRUN e CESPON-ROMERO, 2007;), solos e sedimentos (KRASNODEBSKA et al., 2006; STANISIC et al., 2011; HUANG et al., , 2007; DE VALLEJUELO et al., 2009; DE LA CALLE et al., 2011).

O fundamento da aplicação do ultrassom em procedimentos de extração é baseado no conceito de se empregar uma energia externa que aumente a ação química de um solvente sobre o soluto. Assim, a aplicação de ondas mecânicas, como as ultrassônicas, que se propagam em meios materiais, deve favorecer a interação do solvente com a amostra sólida pela renovação das moléculas do solvente na interface líquido/sólido (JUNIOR et al., 2006).

Na extração assistida por ultrassom, o processo de extração baseia-se no efeito mecânico de cavitação gerado pela ação de ondas mecânicas de baixa frequência (<1 MHz). Esta região, denominada de faixa de baixa frequência e alta potência, proporciona a formação de pequenas microbolhas de cavitação quando a onda atravessa um meio líquido, ocasionando a formação de áreas pontuais de alta pressão e temperatura na solução facilitando o processo de extração dos elementos (LUZ, 1998;

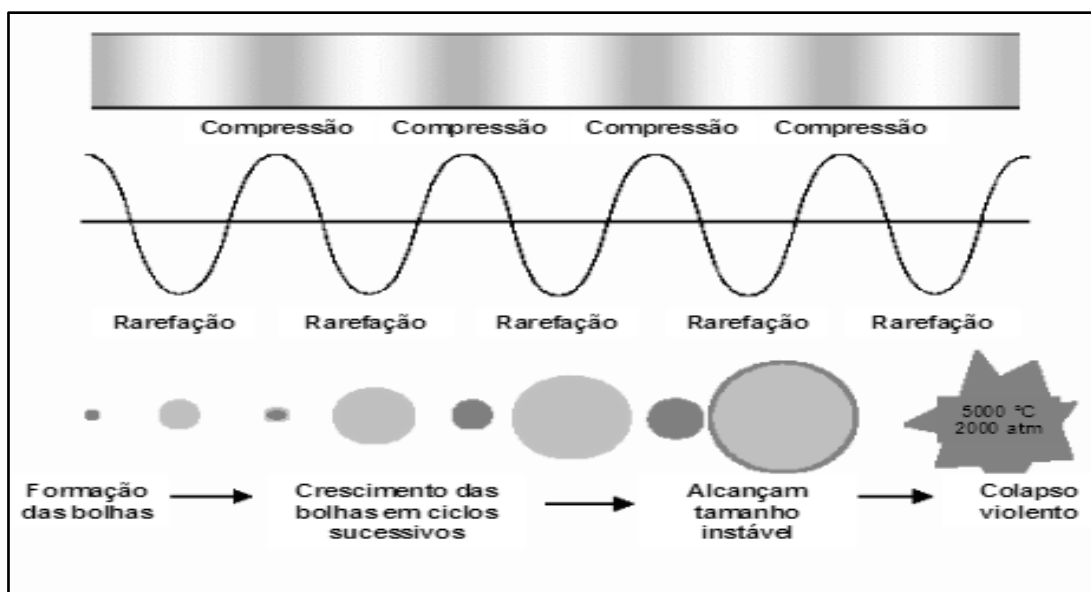
JUNIOR, 2006; NEVES et al., 2009; FERREIRA, 2014; FREITAS, 2015). Este procedimento leva a formação de radicais livres ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) com características oxidantes, na interface entre a bolha e o solvente, aumentando a reatividade química do solvente, que auxiliam, em alguns casos, no processo de decomposição de matéria orgânica. A ocorrência destes fenômenos na superfície das partículas da amostra auxilia na decomposição e dissolução do material (OLIVERA, 2003; KRUG, 2006; PRIEGO-CAPOTE e CASTRO-LUQUE, 2007; PERONICO, 2014). Além disso, ocorre também a projeção de micro jatos a altas velocidades, o que fragmenta as partículas, renova suas áreas superficiais e diminui o tamanho de partícula (Figura 3) (DE LA CALLE, et al., 2009; BENDICHO et al., 2012; LEITE, 2015).



**Figura 3.** Representação da diminuição do tamanho de partícula de um sólido durante a ultrassonicação. A) Pequenas bolhas de gás na superfície do sólido; B) Fenômeno de cavitação de gás sobre a superfície do sólido; C) implosão das bolhas e divisão do sólido; D) Separação das novas partículas formadas (Fonte: LEITE, 2015).

As dimensões dessas bolhas aumentam e diminuem nas consecutivas fases de rarefação (ciclo de baixa pressão) e compressão (ciclos de alta pressão) da onda acústica até que finalmente, sofrem implosão, de tal maneira, que elas podem ser consideradas como micro reatores, os quais podem atingir temperaturas próximas a  $5000^{\circ}\text{C}$  e pressões de 1.000 atmosferas no momento do colapso (Figura 4). Durante a fase de rarefação, uma fração dos gases presentes no líquido é absorvida pela bolha de cavitação, e nos ciclos consecutivos de compressão e rarefação, a bolha tem seu diâmetro modificado até atingir um diâmetro crítico, acima do qual ocorre sua implosão.

É importante ressaltar que alguns fatores podem afetar diretamente a formação, crescimento e colapso das bolhas de cavitação, entre eles a frequência e intensidade do ultrassom, características do solvente, pressão e temperatura do meio, viscosidade e presença de material sólido no meio (JUNIOR et al., 2006; SEIDY e YAMINI, 2012; PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2007).



**Figura 4.** Representação dos ciclos de rarefação, compressão e implosão das bolhas de cavitação (FONTE: GEDANKEN, 2014).

Em procedimentos de preparo de amostra utilizando as ondas ultrassônicas, os processadores comercialmente disponíveis mais utilizados são o banho e as sondas ultrassônicas.

Nos banhos ultrassônicos (Figura 5b), o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, usualmente a água. A energia é irradiada verticalmente pelas ondas sonoras geradas na base do banho e transmitidas através das paredes do vaso para o frasco com a mistura reacional. A frequência e a potência dos banhos de ultrassom dependem do tipo e do número de transdutores usados na sua construção (LUZ, 1998). As principais vantagens do banho ultrassônico são o baixo custo do equipamento e o tratamento simultâneo de várias amostras. Nesse dispositivo, as ondas tem incidência indireta na amostra, ou seja, ela é transmitida através da água colocada dentro do equipamento. É importante ressaltar que os banhos ultrassônicos também apresentam desvantagens como baixa potência de radiação ( $1 \text{ a } 5 \text{ W cm}^{-2}$ ), distribuição não homogênea das ondas ultrassônicas por todo o banho, sendo necessária a verificação da região de maior incidência de ondas ultrassônicas (CAPELO, et al., 2005; JUNIOR et al., 2006; LEITE, 2015).

Outro dispositivo largamente utilizado para extrações assistidas por ultrassom é a sonda ultrassônica (Figura 5a), onde um transdutor ultrassônico é acoplado a uma sonda que comumente é composta por titânio que é submersa no líquido extrator que

contém a amostra, ou seja, a incidência da radiação se dá de forma direta. Com isso, a distribuição das ondas ultrassônicas ao longo da amostra é homogênea. Esse fato traz a grande vantagem do emprego de menores tempos de extração. Contudo, a grande desvantagem desse modelo é a possibilidade de gerar contaminação da amostra, se ocorrer a lixiviação do material da sonda, liberando partículas da mesma para a solução extratora. Outra grande desvantagem desse modelo é o preparo de apenas uma amostra por vez, o que diminui a frequência analítica (CAPELO et al., 2005; LEITE, 2015).



**Figura 5.** a) Ultrassom tipo sonda com UP200Ht (Fonte: Hielscher ultrasonics technology, 2016), b) banho de ultrassom (Spencer, modelo CD 4800) (Fonte: Arquivo pessoal).

Finalmente, a escolha do dispositivo é um fator importante para a eficiência da extração sólido-líquido assistida por ultrassom (LEITE, 2015). Porém, não é o único fator importante que determina a eficiência da extração assistida por ultrassom. Parâmetros como quantidade e tamanho de partículas da amostra, volume de reagentes, concentração da solução extratora, tempo de extração, temperatura do sistema, volume de água no banho de ultrassom podem influenciar significativamente o tratamento das amostras e precisam ser avaliados para garantir a eficiência do processo (JUNIOR et al., 2006, PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2007; MQNUTSEWEE et al., 2007; ALEIXO et al., 2004; PERONICO, 2014; LEITE, 2015).

Entre as vantagens associadas à utilização de energias ultrassônicas em procedimentos de tratamento de amostra pode-se citar: i) menor tempo requerido para o preparo das amostras, ii) menor consumo de reagentes, associada a utilização de reagentes diluídos, iii) maior segurança, uma vez que na grande maioria os procedimentos são realizados em condições de temperatura ambiente, iv) permite

utilizar misturas de ácidos que normalmente são evitados em procedimentos que utilizam energia térmica e v) simplicidade de preparo e baixo custo relativo (PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2007; PERNONICO, 2014).

## **2.6. DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS ALIMENTARES EMPREGANDO A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E A TÉCNICA DE FAAS**

Recentemente, na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos que utilizam a extração assistida por ultrassom para a determinação de íons metálicos em alimentos e bebidas utilizando a técnica de FAAS.

PERONICO et al., 2016 desenvolveram um método para a determinação de Cu, Mn, Ca e Mg em amostras de sementes oleaginosas utilizando como preparo de amostra a extração assistida por ultrassom e a técnica analítica de FAAS. Os melhores resultados obtidos na otimização da extração assistida por ultrassom foram 0,3 g de amostra, 10 mL de ácido nítrico 1,40 mol L<sup>-1</sup>, e 10 minutos de sonicação em banho de ultrassom a 25 °C. De forma similar, MACHADO, BERGMANN e PISTON (2016) determinaram Fe e Zn em amostras de fórmulas infantis a base de leite, utilizando a extração assistida por ultrassom como método de preparo de amostra e a técnica analítica de FAAS. Estes pesquisadores encontraram como condições ótimas 0,5 gramas de amostra, 25 mL de ácido nítrico 15% (v/v) e tempo de extração de 5 minutos. Finalmente, FERREIRA et al., 2014 utilizaram a extração assistida por ultrassom para a determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó, fazendo uso da técnica analítica de FAAS; as melhores condições neste estudo foram 75% (v/v) de ácido nítrico, 30 minutos de extração no banho de ultrassom e temperatura de 50°C.

## **2.7. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

A necessidade de garantir a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida (TAVARES, 2010). Por isso, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004). A validação tem várias definições. Segundo a ANVISA: “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método

atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004); de acordo com a United States Pharmacopedia (USP): “a validação de um método analítico é o processo que fornece uma evidência documentada, através de estudos de laboratório, de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer” (USP, 2007) e a WHO define validação como: “avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que este está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO, 1992).

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para estudos de validação de métodos analíticos são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. No entanto, dependendo da área de atuação e da técnica analítica empregada para análise, devem-se verificar quais parâmetros são realmente necessários no estudo de validação (RIBERO et al., 2008). Nos itens seguintes serão descritos alguns parâmetros de validação utilizados neste estudo.

### **2.7.1. Linearidade e curvas analíticas**

O parâmetro de linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica especificada (BRITO et al., 2003; ICH, 1996; USP, 2007; BRITO, 2001). Essa relação de proporcionalidade é avaliada pela curva analítica ou curva de calibração. As curvas analíticas podem ser obtidas por padronização externa, em que soluções aquosas são preparadas a partir de uma solução padrão; por padronização interna que consiste na preparação das soluções padrão de concentração conhecida de um padrão interno e da amostra e a substância usada como padrão interno deve ser similar a substância a ser quantificada; e por superposição de matriz que consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, sendo este método usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes (RIBANI et al., 2004).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 1996). Se houver relação linear aparente após a análise visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados. Geralmente, a linearidade é avaliada por meio do

coeficiente de correlação ( $r$ ) e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Estes dois coeficientes indicam o grau de ajuste dos dados a curva analítica e não devem ser empregados isoladamente (BRASIL, 2007; BRASIL, 2003; CARDOSO et al., 2010). Segundo a ANVISA o coeficiente de correlação deve ser superior ou igual a 0,99 e segundo o INMETRO deve apresentar valores acima de 0,90 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2007; RIBANI et al., 2004). O coeficiente de determinação  $R^2$  que determina a variabilidade dos dados experimentais, é geralmente usado para avaliar o ajuste de um modelo e, conseqüentemente, a qualidade da regressão; o valor deste coeficiente pode variar entre  $0 \leq R^2 \leq 1$ , ou seja, quanto mais próximo de 1 mais o modelo consegue descrever a variação em  $y$  e maior será a qualidade da regressão (PIMENTEL e NETO, 1996; FERREIRA, 2016). Além disso, pode-se aplicar um teste- $F$  para avaliar a significância da regressão linear, em que valores de  $F_{regressão} > F_{critico}$  e  $p < 0,05$ , indicam que a regressão linear é significativa (CARDOSO et al., 2010). Ainda, para avaliar se o modelo é ou não adequado, ou seja, ele se ajusta aos dados experimentais, pode-se aplicar um teste de falta de ajuste (do inglês *Lack-of-fit*), em que se espera que o valor de  $F_{falta\ de\ ajuste} < F_{critico}$  e  $p > 0,05$ . Se ambas as hipóteses forem aceitas, pode-se confirmar que o modelo linear é adequado para o estudo e não apresenta falta de ajuste e, portanto, existe linearidade na faixa de concentrações investigada na curva analítica (FEINBERGA e RAGUENES, 1999; ANDRADE, 2014; ANDOLFATTO, 2016).

### 2.7.2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (DQU). O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (ICH, 1996; CURRIE, 1999; BRITO, 2001; BRITO et al., 2003), enquanto que o limite de quantificação indica a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003). As estimativas dos limites de detecção e de quantificação, no caso da utilização de métodos instrumentais podem ser determinadas pelas equações 1 e 2 (BRITO et al., 2003):

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad \text{Equação 1}$$



$$LQ = \frac{10S_B}{b}$$

Equação 2

em que:

$S_B$  = desvio padrão das medidas do branco analítico

$b$  = inclinação da curva de calibração

### 2.7.3. Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Usualmente, é expressa como o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas (RIBEIRO, 2008; BRITO et al., 2003; HUBERT, 1999; STUBBERUD e ASTROM, 1998). A precisão pode ser expressa pela equação 3:

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

De acordo com o INMETRO a precisão pode ser expressa em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas, condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista e mesmo instrumento (RIBANI et al., 2004). A precisão intermediária, de acordo com a ISO 5725-3, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostra idêntica ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais) tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos (BRASIL, 2011). A reprodutibilidade estima o grau de concordância dos resultados de uma mesma amostra, porém variando todas as condições simultaneamente (analista, instrumento, laboratório e tempo), sendo esta última estimativa utilizada para a padronização de metodologias em estudos colaborativos (BRASIL, 2007).

### 2.7.4. Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão de um método analítico é geralmente avaliada por um dos seguintes procedimentos:

análise de material de referência certificado (MRC), aplicação de um método de reconhecida exatidão e teste de adição e recuperação (THOMPSON et al., 2002; TAVARES, 2010; BRANDÃO, 2010).

Materiais de referência certificados (MRC) são os materiais de controle preferidos, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. Entretanto, o alto custo do MRC e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso (WESLEY, POCKLINGTON e WALKER, 1991; BRITO et al., 2003). Ensaio de recuperação são geralmente utilizados para avaliar a exatidão, já que a recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003). A exatidão também pode ser avaliada por comparação de métodos, que consiste na comparação entre os resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida (RIBANI et al., 2004). Para avaliar a exatidão por comparação de métodos são aplicados testes estatísticos, que incluem a regressão linear e o *test-t* pareado (BRITO et al., 2003; SPINOLA et al., 2014; ANDOLFATTO, 2016).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **3.1.1. Amostragem**

Para o estudo de otimização foi utilizada a amostra de farinha de chia identificada como FC4. Para o estudo de validação e de aplicação da metodologia analítica foram utilizadas oito amostras de sementes de chia (SC1 a SC8) e cinco amostras de farinhas de chia (FC1 a FC5) provenientes de diferentes fabricantes e adquiridas em supermercados e outros estabelecimentos comerciais no período de 2015 a 2016. Essas amostras foram armazenadas em suas embalagens de origem em um local arejado e seco até a realização dos ensaios. Após o preparo das amostras de chia (moagem e peneiramento) para análise dos metais por FAAS, estas foram estocadas em frascos fechados de polipropileno.

As amostras de chia foram identificadas com letras e números e informações pertinentes destas são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Informações relevantes das amostras de sementes e de farinhas de chia

ID <sup>1</sup>	Apresentação <sup>2</sup>	Procedência <sup>3</sup>	Lote
SC1	Sementes	Osasco-SP	3440151
SC2	Sementes	Guarujá do Sul-SC	0062
SC3	Sementes	Bandeirantes-MS	00012814
SC4	Sementes	São Paulo-SP	-
SC5	Sementes	Sertãozinho-SP	029
SC6	Sementes	Coronel Bicaco-RS	032016
SC7	Sementes	Porto Alegre-RS	160302
SC8	Sementes	Curitiba-PR	150213
FC1	Farinha	Jaragua do sul-SC	12286
FC2	Farinha	São Paulo-SP	L
FC3	Farinha	Ponta grossa-PR	-
FC4	Farinha	Curitiba-PR	141118
FC5	Farinha	Londrina-PR	-

ID<sup>1</sup>= Identificação das amostras de sementes (SC) e de farinhas de chia (FC); <sup>2</sup> Apresentação comercial da chia (sementes ou farinhas), <sup>3</sup> Local de processamento e envase das amostras.

### 3.1.2. Reagentes

Em todos os experimentos foi empregada água deionizada obtida em um sistema de purificação de osmose reversa OS 10LX TQ50 (GEHAKA).

Todas as soluções utilizadas ao longo do trabalho experimental foram preparadas empregando-se reagentes de grau analítico: ácido nítrico 65% (v/v) (FMaia, Brasil) e peróxido de hidrogênio 33% (m/v) (Biotec). As soluções analíticas dos íons metálicos Mn, Zn, Fe, Ca e Mg foram preparadas diariamente a partir de diluições de soluções padrão de 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol).

### 3.1.3. Equipamentos e parâmetros instrumentais

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram balança analítica (Shimadzu, modelo AUW220D), micropipetas (Labmate-HTL) com diferentes capacidades, chapa de aquecimento (Novatecnica), peneira (Bertel abertura de 28 Mesh), moedor de café e

grãos (Cuisinart, modelo DCG-20BKN), banho de ultrassom (Spencer, modelo CD 4800 com potência de 70 W e frequência de 42 kHz).

Para a determinação dos íons metálicos Mn, Zn, Fe, Ca e Mg foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica em chama – FAAS (Varian, modelo AA 220) (Figura 6) e para a atomização foi utilizada uma chama composta de ar/acetileno para Mn, Zn, Fe e Mg e de acetileno/óxido nítrico para Ca. Lâmpadas de cátodo oco da Varian e da Agilent foram utilizadas para cada elemento analisado empregando-se as condições operacionais recomendadas pelo fabricante do equipamento (Tabela 5).

**Tabela 5.** Parâmetros operacionais empregados na determinação de Fe, Ca, Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia por FAAS

Parâmetros	Mn	Zn	Mg	Fe	Ca
<i>Comprimento de onda (nm)</i>	279,5	213,9	285,2	248,5	422,7
<i>Corrente de lâmpada (mA)</i>	5	5	4	5	10
<i>Largura fenda (nm)</i>	0,2	1,0	0,5	0,2	0,1
<i>Fluxo de acetileno (L min<sup>-1</sup>)</i>	1,50	1,50	1,50	1,5	1,5
<i>Fluxo de ar (L min<sup>-1</sup>)</i>	3,50	3,50	3,50	3,5	3,5



**Figura 6.** Espectrômetro de absorção atômica em chama (Fonte: Arquivo pessoal)

#### **3.1.4. Limpeza dos materiais**

Previamente ao uso, todo o material empregado foi lavado com água e detergente, e posteriormente enxaguado com água destilada e colocado em banho de HNO<sub>3</sub> (3%, v/v) em um recipiente plástico com tampa por um tempo mínimo de 24 h. Após a retirada do banho ácido, o material foi lavado com água destilada e deixado em bandejas plásticas previamente descontaminadas. Durante todo o processo de limpeza e realização dos ensaios, os materiais foram manipulados em bancadas previamente descontaminadas com álcool em gel 70% (v/v) e para a manipulação de todo o material foram utilizadas luvas sem talco, para evitar possíveis contaminações com metais.

### **3.2. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA O PREPARO DA AMOSTRA**

A proposta do trabalho foi otimizar e validar uma metodologia analítica para a determinação de íons metálicos em amostras de sementes e de farinhas de chia por FAAS empregando-se como método alternativo de preparo de amostra a extração assistida por ultrassom e como método de referência a digestão por via úmida. Na Tabela 6, são apresentados os procedimentos utilizados para a obtenção das soluções para as análises dos íons metálicos Mn, Zn, Fe, Ca e Mg em sementes e farinhas de chia.

**Tabela 6.** Procedimentos de preparo de amostra adotados para a análise de Mn, Zn, Fe, Ca e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia.

<b>Métodos</b>	<b>Procedimentos</b>
<i>Extração assistida por ultrassom</i>	<p>Macerar e peneirar uma quantidade em torno de 100 gramas das sementes ou das farinhas de chia até um tamanho de partícula de 600 µm</p> <p>Pesar uma massa de 0,5 gramas de sementes ou de farinhas de chia</p> <p>Adicionar 25 mL de HNO<sub>3</sub> 5% (v/v) em béquer de 100 mL</p> <p>Cobrir as soluções com vidro relógio</p> <p>Submeter a solução a sonicação em banho de ultrassom por 30 minutos em temperatura ambiente</p> <p>Filtrar o sobrenadante (papel filtro qualitativo)</p> <p>Analisar o filtrado por FAAS</p>
<i>Digestão por Via Úmida</i>	<p>Macerar e peneirar uma quantidade em torno de 100 gramas das sementes ou das farinhas de chia até um tamanho de partícula de 600 µm</p> <p>Pesar uma massa de 0,5 gramas de sementes ou farinhas de chia em béquer de 100 mL</p> <p>Adicionar 10,0 mL de HNO<sub>3</sub> (65%, v/v)</p> <p>Cobrir a solução com vidro de relógio</p> <p>Aquecer em banho de areia a 100 °C por 4 horas</p> <p>Adicionar 4,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% (m/v)</p> <p>Aquecer por 4 horas até próximo da secura a 90 °C</p> <p>Diluir para 25,0 mL com água destilada</p> <p>Analisar por FAAS</p>

### **3.3. OTIMIZACAO DO METODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Um planejamento fatorial em dois níveis foi empregado com o objetivo de avaliar a influência das variáveis: concentração da solução extratora (%HNO<sub>3</sub>, v/v) e tempo de sonicação (minutos) na extração dos íons metálicos Fe, Ca, Mn, Zn e Mg de farinhas e sementes de chia. O planejamento fatorial completo empregado nesse procedimento foi 2<sup>2</sup>, totalizando quatro experimentos em quadruplicatas da amostra de farinha de chia (FC4). Na Tabela 7, são apresentadas as variáveis estudadas e os respectivos níveis avaliados para a otimização do preparo de amostra usando a extração assistida por ultrassom.

**Tabela 7.** Fatores e níveis no planejamento fatorial  $2^2$  para a determinação de íons metálicos em farinha de chia por FAAS.

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
a. Concentração de HNO <sub>3</sub> (% , v/v)	5	20
b. Tempo de extração (min.)	10	30

Os efeitos do planejamento fatorial foram calculados pela Equação 4:

$$E_f = (R+) - (R-) \quad (\text{Equação 4})$$

em que  $\bar{R}^+$  e  $\bar{R}^-$  são as diferenças das médias dos níveis (+) e (-), respectivamente, dos fatores envolvidos. Os efeitos das variáveis nos teores de íons metálicos em sementes e farinhas de chia foram testados para a significância estatística no nível de 95% de confiança pelo cálculo do erro padrão e pelo gráfico de Pareto. A análise estatística dos dados foi realizada empregando-se o software estatístico *Minitab* for Windows v.16.2.2 (MINITAB, 2010).

### 3.4. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM COMO PREPARO DE AMOSTRA

A validação do método de preparo de amostra usando a extração assistida por ultrassom para a determinação de íons metálicos em sementes e farinhas de chia por FAAS foi realizada pela análise dos parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão seguindo as recomendações de guias da Anvisa, Inmetro, AOAC e NATA. Todas as análises estatísticas foram realizadas no nível de 95% de confiança, utilizando o software estatístico *Minitab* for Windows 16.2.2 (MINITAB, 2010).

#### 3.4.1. Linearidade e Curvas de calibração

As curvas analíticas foram obtidas pelo método de padronização externa com dissolução dos padrões em solução aquosa. As curvas de calibração foram construídas dentro da faixa linear de cada elemento (Tabela 8), sendo cada ponto analisado em duplicata. A linearidade foi verificada pela aplicação da técnica de regressão linear e de um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança (ARAÚJO, 2009).



**Tabela 8.** Faixas lineares de Fe, Ca, Mn, Zn e Mg utilizadas para o estudo de linearidade.

<b>Metal</b>	<b>Faixa linear (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Mn	0,3 - 1,5
Zn	0,2 - 1,0
Mg	0,1 - 0,8
Fe	0,5 - 2,5
Ca	0,2 - 1,5

### **3.4.2. Limites de detecção e de quantificação**

Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados utilizando-se os dados da equação da curva de calibração de cada metal (ARAUJO, 2009). A determinação dos respectivos limites foi realizada a partir do desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico (branco) e da inclinação (coeficiente angular) da curva de calibração de acordo com as equações 1 e 2 (ANDRADE et al., 2014; ARAUJO, 2009; NATA, 2012; BRITO, et al.; 2003; ANVISA, 2003; ICH,1996).

### **3.4.3. Precisão**

A precisão do método foi avaliada através da comparação das variâncias ponderadas ( $S_p^2$ ) de cada um dos métodos de preparo de amostra (extração assistida por ultrassom e digestão por via úmida), pela aplicação de um teste *F* e pelo cálculo de intervalos de confiança para a razão entre variâncias (INMETRO, 2011; WERNIMONT, 1985). A precisão também foi expressa em termos de repetitividade, onde foram preparadas cinco réplicas verdadeiras de uma amostra de farinha de chia (FC2) usando o procedimento descrito no item 3.2 e os resultados obtidos foram utilizados no cálculo do RSD (%), de acordo com a equação 3.

### **3.4.4. Exatidão**

A exatidão do método proposto (extração assistida por ultrassom) foi avaliada pela comparação com um método de referência (digestão por via úmida), aplicando-se um teste-*t* pareado nas diferentes amostras de sementes e farinhas de chia e por uma análise de regressão linear, ambos no nível de 95% de confiança (NATA, 2012; WERNIMONT, 1985).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM POR PLANEJAMENTO FATORIAL

No presente trabalho com o intuito de otimizar a extração dos íons metálicos Mn, Zn, Mg, Ca e Fe em farinha de chia utilizando o banho de ultrassom foi aplicado um planejamento fatorial ( $2^2$ ) (Tabela 9) para avaliar e determinar a influencia das seguintes variáveis: concentração de ácido nítrico (% v/v) e tempo de extração (minutos). As variáveis: tamanho de partícula, temperatura e posição no banho de ultrassom permaneceram constantes. Essas variáveis foram mantidas constantes, pois são condições recomendadas na literatura como ótimas e podem interferir nos resultados se não forem controladas (NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2012; MACHADO, BERGMANN e PISTON, 2016). O tamanho de partícula adotado foi de 600 $\mu$ m, a temperatura do banho foi igual a temperatura ambiente e a posição no banho de ultrassom da solução extratora contendo a amostra foi no centro a 0 cm do fundo. Os resultados do planejamento fatorial e os efeitos calculados são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Teores dos íons metálicos Fe, Mn, Zn, Mg e Ca em farinha de chia e seus desvios padrão obtidos no planejamento fatorial  $2^2$ .

Concentração de HNO <sub>3</sub> (% v/v)	Tempo de extração (min)	Quantidade média ( $\mu$ g/g) $\pm$ desvio-padrão <sup>1</sup>				
		Fe	Mn	Zn	Mg	Ca
5 (-)	10 (-)	51,9 $\pm$ 2,3	56,9 $\pm$ 1,0	60,3 $\pm$ 6,0	7579 $\pm$ 106	8551 $\pm$ 257
20 (+)	10 (-)	50,3 $\pm$ 1,0	50,4 $\pm$ 1,3	51,0 $\pm$ 2,2	7663 $\pm$ 185	9083 $\pm$ 375
5 (-)	30 (+)	56,6 $\pm$ 1,7	57,4 $\pm$ 2,0	57,6 $\pm$ 4,2	7622 $\pm$ 171	8290 $\pm$ 390
20 (+)	30 (+)	56,7 $\pm$ 2,1	52,7 $\pm$ 1,2	56,4 $\pm$ 4,0	7711 $\pm$ 123	8590 $\pm$ 424

<sup>1</sup> Desvios padrão calculados a partir das quadruplicatas dos ensaios do planejamento fatorial

Os efeitos médios calculados do planejamento fatorial  $2^2$  são apresentados na Tabela 10.

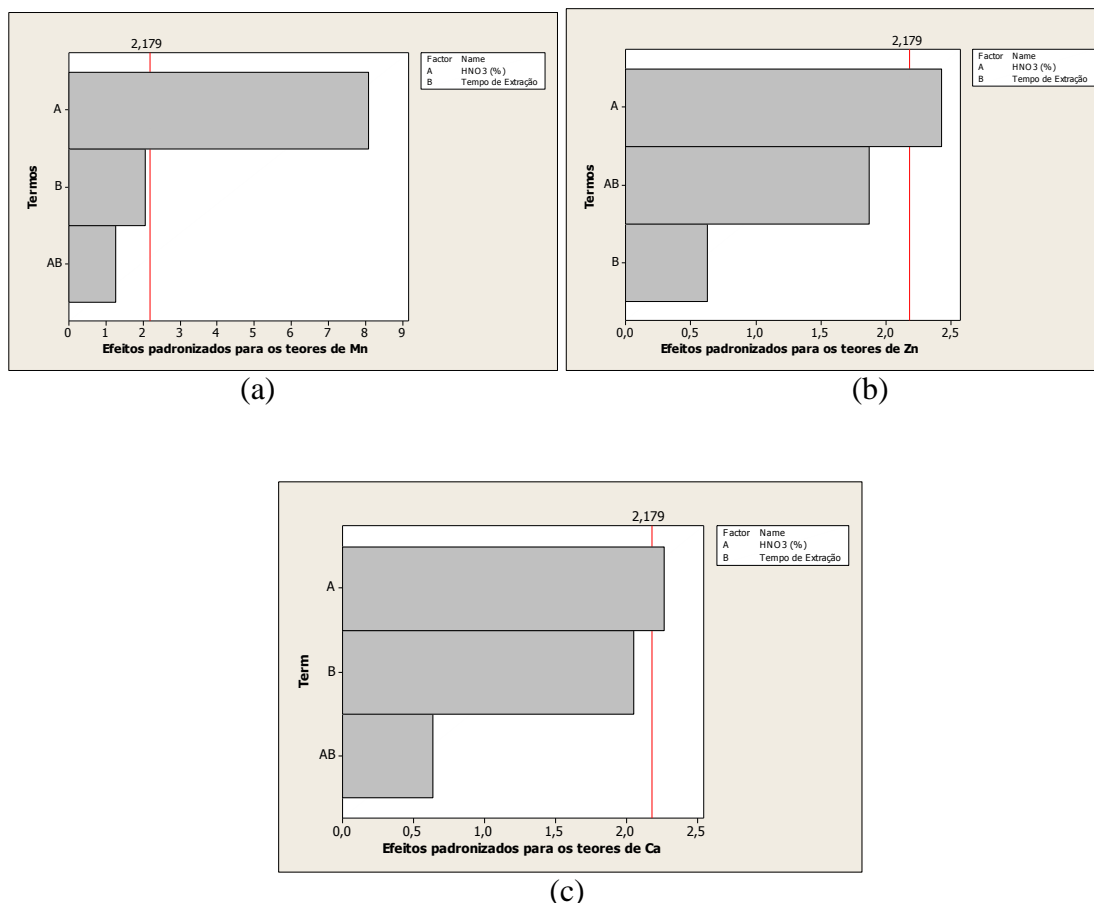
**Tabela 10.** Efeitos médios calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial  $2^2$  para os teores de Fe, Mn, Zn, Mg e Ca em farinha de chia.

Efeitos	Estimativas $\pm$ Erro padrão <sup>a,b</sup>				
	Fe	Mn	Zn	Mg	Ca
<b>Media global</b>	53,86 $\pm$ 0,56	54,37 $\pm$ 0,35	56,34 $\pm$ 1,08	7643 $\pm$ 37,5	8628 $\pm$ 91,5
<b>Efeitos principais:</b>					
Concentração de HNO <sub>3</sub> % (v/v) (A):	0,74 $\pm$ 1,13	-5,60 $\pm$ 0,69	-5,25 $\pm$ 2,16	87,0 $\pm$ 74,9	416 $\pm$ 183
Tempo de extração (min.) (B):	5,57 $\pm$ 1,13	1,43 $\pm$ 0,69	1,36 $\pm$ 2,16	45,0 $\pm$ 74,9	-377 $\pm$ 183
<b>Efeito de Interação de dois fatores:</b> (A)X(B)	0,85 $\pm$ 1,13	0,87 $\pm$ 0,69	4,04 $\pm$ 2,16	3,0 $\pm$ 74,9	-116 $\pm$ 183

<sup>a</sup> O erro padrão dos efeitos foi calculado a partir dos desvios padrão apresentados na Tabela 6.

<sup>b</sup> Efeitos maiores que 2,46 para Fe; 1,50 para Mn; 4,71 para Zn; 163,2 para Mg e 398,9 para Ca são significativos no nível de 95% de confiança.

A partir da análise do teste-*t* e da análise do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança (Figura 7) foi considerada como variável significativa para a extração dos íons metálicos Mn, Zn e Ca a concentração de ácido nítrico (%v/v) com valores de  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$  e valores de  $p < 0,05$ .



**Figura 7.** Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial para a extração assistida por ultrassom dos metais a) Mn, b) Zn e c) Ca em farinha de chia.

Além disso, não foi observado um efeito de interação significativo entre as duas variáveis estudadas na extração de nenhum dos íons metálicos avaliados. Isto significa que a concentração de ácido nítrico pode ser otimizada de forma univariada, pois seu efeito não depende dos níveis do tempo de extração e vice versa.

Na aplicação da extração assistida por ultrassom, como preparo de amostra para a determinação de íons metálicos em farinha de chia por FAAS, observou-se uma redução do teor de Mn e Zn quando a concentração de HNO<sub>3</sub> foi elevada de 5% para 20% (v/v). Tanto a influência da concentração quanto a natureza do ácido na solução extratora são considerados os fatores mais críticos para a extração assistida por ultrassom e são dependentes diretamente do tipo de amostra a ser analisada (DE LA CALLE, et al., 2013; MACHADO, BERGMAN e PISTÓN, 2016). A concentração do ácido é essencial no processo de extração dos íons metálicos, uma vez que o íon H<sup>+</sup> é o responsável pelo deslocamento dos íons metálicos presentes na matriz sólida da amostra para o meio líquido extrator. Adicionalmente, a natureza do ácido empregado também

pode exercer um papel importante, uma vez que o seu poder oxidante pode auxiliar na oxidação da amostra, liberando mais facilmente os íons metálicos para a solução extratora (DE PAULA et al., 2013; PERONICO et al., 2016) Além disso, na literatura foram reportados estudos que usam concentrações de ácido diluído para a extração assistida por ultrassom de íons metálicos. Lima, Richter e Muñoz (2011) abordam a utilização de ácido nítrico em concentrações de 50% (v/v), concluindo que em concentrações elevadas não há aumento significativo na extração de íons metálicos em fertilizantes inorgânicos.

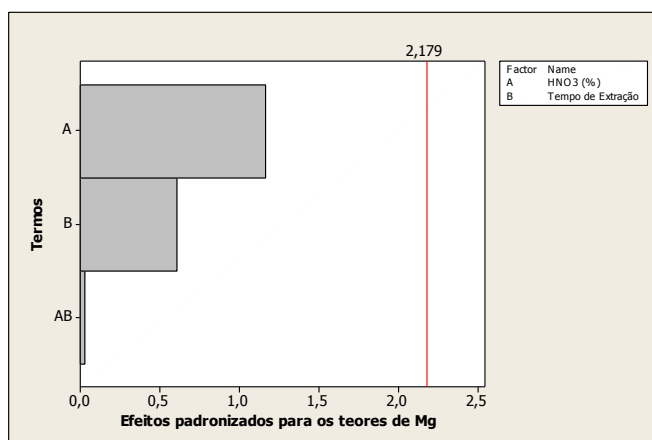
Os resultados do planejamento fatorial indicaram que para a extração de Zn e Mn de farinha de chia a concentração da solução de ácido nítrico diluída de 5 % (v/v) tem como resultado teores mais altos destes íons metálicos, fato que concorda com o reportado pela literatura, já que a utilização de HNO<sub>3</sub> concentrado (65%, v/v) como solução extratora resulta na supressão do sinal analítico devido ao fato que altas concentrações de ácido podem alterar as propriedades físico-químicas da solução da amostra ocasionando interferências (FERREIRA et al.,2014).

Por outro lado, os resultados do planejamento fatorial também sugerem que o aumento da concentração da solução extratora de HNO<sub>3</sub> de 5,0 para 20% (v/v) foi relevante para a extração de Ca em farinha de chia. Este comportamento pode ser explicado devido às ligações fortes entre a matéria orgânica e este elemento, já que a chia, por ser uma semente oleaginosa, tem um alto conteúdo de ácido fítico que possui características quelantes que interferem na biodisponibilidade dos minerais (MOSHA et al, 1995; FERREIRA, 2013),

O ácido fítico pode ser encontrado principalmente na casca de castanhas, sementes e grãos (HURRELL, 2003; FERREIRA, 2013) sua molécula possui seis prótons fortemente dissociados com  $pK$ 's menores do que 3,5 e seis prótons fracamente dissociáveis com  $pK$ 's entre 4,6 e 10 sugerindo o forte potencial quelante da estrutura (ERDMAN, 1979; NOLAN et al., 1987; SILVA e SILVA, 1999). DENDOUGUI e SCHWEDT (2004) analisaram *in vitro* a capacidade de ligação do cálcio ao ácido fítico em diferentes amostras de alimentos tendo como resultado que a capacidade deste elemento em ligar-se a este ácido está relacionada ao pH. Além disso, quando o Ca está presente em concentrações elevadas pode formar complexos com 5 ou 6 cátions por cada molécula de fitato ([Ca]<sub>5</sub>-fitato ou [Ca]<sub>6</sub> fitato), podendo existir outros complexos dependendo da concentração de Ca presente; os complexos hexa-penta-tetra e tricalcio

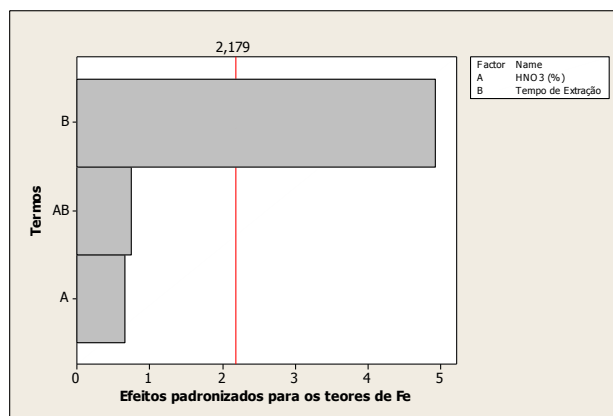
são insolúveis e os complexos mono e dicálcio são solúveis (NOLAN et al., 1987; DOMINGUEZ et al., 2002). Portanto, os maiores teores de Ca extraídos com o uso de solução de HNO<sub>3</sub> 20% (v/v) podem ser atribuídos às ligações dos complexos insolúveis que são formados entre o ácido fítico e o cálcio, e por isso é necessária uma concentração mais alta de ácido nítrico para a extração deste elemento da matriz de chia. É importante ressaltar que os complexos insolúveis fitato-cálcio são considerados como os principais responsáveis da redução da biodisponibilidade de outros minerais como Fe e Zn, já que eles podem se ligar ao complexo fitato-cálcio para formar um complexo ainda menos solúvel (ZHOU e ERDMAN, 1995; PLAAMI, 1997; DOMINGUEZ et al., 2002)

Para os teores de Mg a análise do teste-*t* no nível de 95% de confiança demonstrou que nenhum dos fatores estudados é significativo (Figura 8) pois o valor de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$  e o valor de  $p > 0,05$  e como verificado anteriormente não foi observado um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas no planejamento fatorial também para este elemento.



**Figura 8.** Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial para a extração de Mg em farinha de chia por ultrassom.

Os resultados do planejamento fatorial para o teor de Fe indicaram que o fator tempo de extração no banho de ultrassom é uma variável significativa (Figura 9) obtendo-se como resultados do teste-*t* no nível de 95% de confiança um valor de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$  e um valor de  $p > 0,05$  e novamente os resultados do planejamento fatorial demonstraram não haver um efeito de interação importante entre as variáveis estudadas.



**Figura 9.** (a) Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial para a extração de Fe de farinha de chia por ultrassom.

Os resultados obtidos pelo planejamento fatorial são similares aos descritos por FERREIRA et al (2014) e NEVES et al. (2009) os quais observaram que para a extração do Fe em amostras de achocolatado em pó e alimentos para peixe, precisa-se manter a amostra por mais tempo no ultrassom quando comparado ao tempo de extração de outros íons metálicos. Além disso, estes pesquisadores reportam tempos maiores que 30 minutos para conseguir extrair o Fe das amostras estudadas, já que provavelmente as ligações entre o ferro e a matéria orgânica são muito fortes. Como já foi mencionado anteriormente a chia contém ácido fítico e ele apresenta um alto potencial quelante, complexando íons metálicos, tanto em solução quanto no estado sólido, e interagindo fortemente com os íons metálicos Fe (II) e Fe (III) dependendo do valor de pH (QUIRRENBACH et al., 2009).

Alguns fatores, tais como, pH, concentração e presença de outros minerais influenciam a ligação e presença de minerais ao fitato (WYATT e TRIANA-TEJAS, 1994; SILVA e SILVA, 1999). Nos alimentos, sob condições naturais, o ácido fítico encontra-se carregado negativamente, o que lhe confere alto potencial para complexação com moléculas carregadas positivamente como cátions e proteínas (CHERYAN, 1980; SILVA e SILVA, 1999). O ácido fítico presente na chia é capaz de ligar-se aos cátions minerais estudados Fe, Ca, Mn, Mg e Zn e então formar complexos insolúveis, difíceis de sofrer hidrólise e menos disponíveis para a absorção pelo organismo, afetando a bioacessibilidade desses minerais. (SOUZA, 2015).

Na formação dos complexos de fitato com íons metálicos, quando maior é a relação carga/raio do íon, maior é a constante de formação do complexo, logo é mais

facil de ser formado. A interacao do acido fitico e seus fitatos com os cátions acontece pelos atomos de oxigenio e depende da natureza do ion e de sua carga (VOHRA et al., 1965; SOUZA, 2015). O ordem da razao carga/raio para ions metalicos  $P^{3+}$  (0,068) >  $Cu^{2+}$  (0,055) >  $Fe^{2+}$  (0,032) >  $Mn^{2+}$  (0,029) >  $Mg^{2+} = Zn^{2+}$  (0,027) >  $Ca^{2+}$  (0,020) >  $K^+$  (0,07) (SHRIVER e ATKINS, 2008; SOUZA, 2015). De acordo com a relacao carga/raio o complexo mais facil a ser formado neste estudo seria o Fe apresentado ligacoes fortes com o acido fitico e dificiais de quebrar demonstrando uma relacao com os resultados obtido do planejamento fatorial já que é necessario mais tempo de sonicacao para extrair o Fe das amostras de chia que para a extracao dos otros metais analisados.

Finalmente, com os resultados obtidos na otimizacão multivariada pode-se sugerir que a concentracão de soluçao extratora  $HNO_3$  5% (v/v) e 30 minutos de extracão por ultrassom são as melhores condições para a determinacão de Mn, Zn e Mg em farinhas de chia por FAAS. Para os outros metais verificou-se a necessidade de estudos mais aprofundados com relacão à concentracão da soluçao extratora para o Ca e com relacão ao tempo de extracão para o Fe.

Posteriormente, a condiçao otimizada foi aplicada na determinacão de Mn, Zn e Mg na amostra FC4 por FAAS e os resultados obtidos foram comparados com os determinados pelo método de referencía (digestão por via úmida). Os resultados do método alternativo de preparo de amostra (extracão assistida por ultrassom) e o método de referencía (digestão por via úmida) são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Comparacão entre a extracão assistida por ultrassom com a digestão por via úmida para a determinacão de Mn, Zn e Mg em farinha de chia.

Metal	Tipos de Preparo de Amostra ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>a</sup>			
	Digestão por via úmida	Extracão assistida por ultrassom	$t_{\text{calculado}}$	$p$ valor
<b>Mn</b>	42,60 ± 0,63	42,28 ± 0,08	1,32	0,258
<b>Zn</b>	46,64 ± 1,31	48,36 ± 0,99	1,91	0,129
<b>Mg</b>	4035 ± 42,3	4136,7 ± 32,3	3,15	0,088

<sup>a</sup> valores expressos como médias e desvios-padrão em  $\mu\text{g/g}$ .

Aos resultados obtidos se aplicou um teste- $t$  no nível de 95% de confianca para a comparacão do novo método alternativo de preparo de amostra (extracão assistida por



ultrassom) com o método de referência (digestão por via úmida). A análise do teste-*t* sugeriu que os métodos de preparo de amostra não têm diferenças significativas no nível de 95% de confiança com  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$  e  $p > 0,05$  para os íons metálicos avaliados.

Em outras palavras, as condições determinadas no planejamento fatorial para a extração assistida por ultrassom foram ótimas para a extração de Mn, Zn e Mg em amostras de chia. Posteriormente, para o estudo de validação foi adotada esta mesma condição para a determinação destes íons metálicos em farinhas e sementes de chia.

## **4.2. VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA A DETERMINAÇÃO DE Mn Zn E Mg EM SEMENTES E FARINHAS DE CHIA**

A validação de um método deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

É relevante desenvolver e validar novos métodos analíticos para a determinação de íons metálicos em alimentos que apresentem resultados confiáveis e que possam ser implantados em laboratórios de controle de qualidade ou de fiscalização, ou reproduzidos em laboratórios de pesquisa. Além disso, é de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos para os processos de controle de qualidade a fim de controlar a composição química dos alimentos (TAHAM et al., 1995; NUNES et al., 2011).

### **4.2.1. Linearidade e curvas analíticas**

A calibração instrumental foi realizada por padronização externa em solução aquosa (PE). Os dados obtidos nas curvas analíticas de padrão externo são apresentados na Tabela 12 e na Figura 4 e foram utilizados para a avaliação da linearidade.

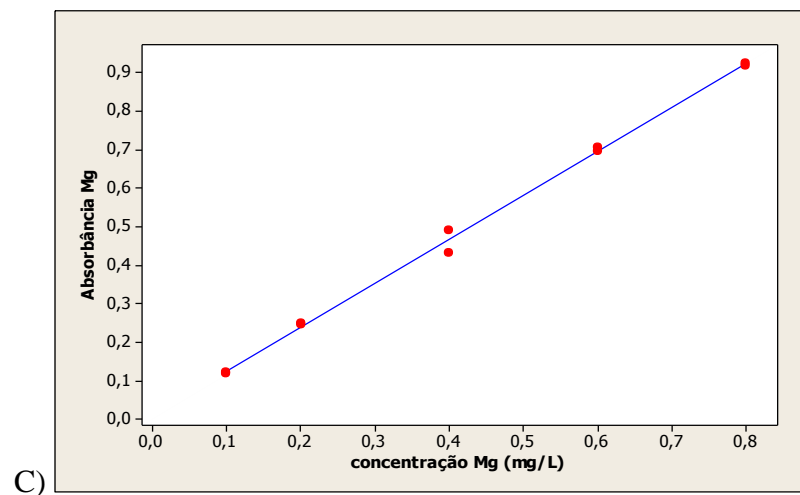
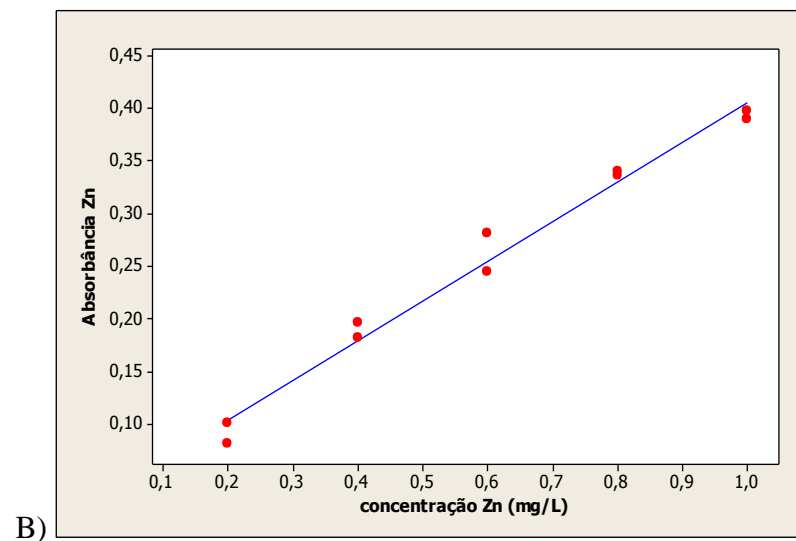
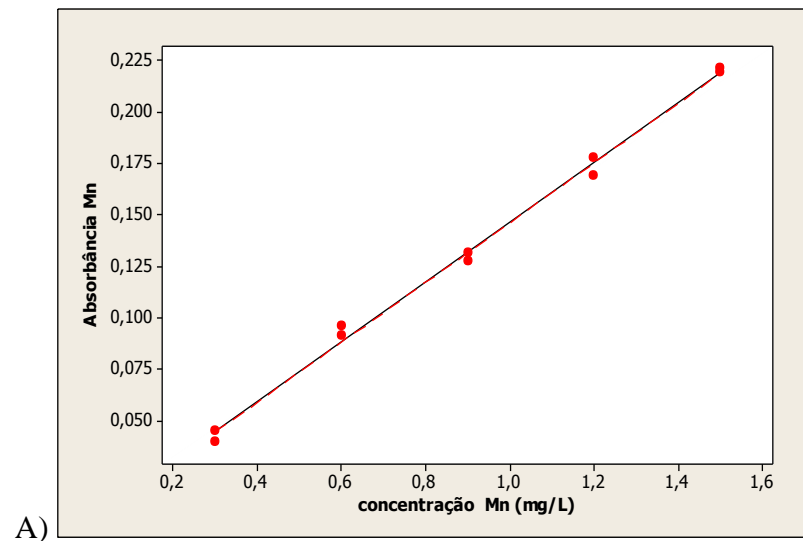
**Tabela 12.** Parâmetros de calibração e linearidade.

<i>Metal</i>	<i>Parâmetros da regressão</i>		<i>Regressão<sup>a</sup></i>			<i>Falta de ajuste<sup>b</sup></i>	
	<i>Equação</i>	<i>r</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>F<sub>obs</sub></i>	<i>p-valor</i>	<i>F<sub>faj</sub></i>	<i>p-valor</i>
<i>Mn</i>	A = 0,0008+0,145[Mn] (±0,004)	0,998	99,6	1861,43	0,000	2,24	0,201
<i>Zn</i>	A = 0,0284+ 0,377[Zn] (±0,016)	0,991	98,2	442,79	0,000	1,88	0,251
<i>Mg</i>	A = 0,0098+ 1,14[Mg] (±0,015)	0,999	99,8	3365,61	0,000	0,27	0,847

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

O parâmetro de linearidade permite verificar a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (ANVISA, 2003; NATA, 2002; ANDRADE et al., 2014). A linearidade do método proposto foi avaliada pela aplicação da técnica de regressão linear e do teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança (ARAUJO, 2009).

Os resultados da análise de regressão linear (Tabela 12) sugeriram que esta é altamente significativa ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$  com  $p < 0,05$ ). Além disso, o coeficiente de correlação linear está dentro dos limites recomendados ( $r > 0,99$ ) pela ANVISA (2003) demonstrando haver uma possível relação linear entre a absorbância e a concentração (Figura 10) (BRASIL, 2011; ARAUJO, 2009).



**Figura 10.** Curvas analíticas para a determinação de A) Mn, B) Zn e C) Mg por FAAS

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) que determinam a variabilidade dos dados experimentais apresentaram valores elevados indicando que mais de 98% da variabilidade é explicada pelo modelo linear e sugerindo que menos de 2% da variação nos dados é explicada pelos resíduos (FREIRE et al.; 1999).

Para verificar se o modelo linear gerado se ajustava bem aos dados experimentais foi aplicado um teste de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) no nível de 95% de confiança. Os resultados obtidos indicaram que para todas as curvas analíticas o  $F_{faj}$  é inferior ao valor de  $F_{critico}$  com  $p > 0,05$ . Assim pode-se concluir que a regressão linear é altamente significativa para todas as curvas analíticas estudadas, sem falta de ajuste do modelo linear. Portanto, pode-se afirmar que as curvas analíticas apresentam linearidade na faixa de concentração investigada e podem ser utilizadas para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e farinhas de chia fazendo uso da extração assistida por ultrassom como preparo de amostra.

#### **4.2.2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)**

Para avaliar se o método proposto possibilitaria a determinação dos íons metálicos Mn, Zn e Mg por FAAS nas amostras de sementes e farinhas de chia em baixas concentrações foram calculados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, enquanto o LQ representa a menor concentração do analito que o equipamento pode quantificar com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). Os valores de LD e de LQ foram obtidos utilizando-se os dados da curva analítica e as Equações 1 e 2 apresentadas no item 3.4.2. Os resultados são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Comparação dos limites de detecção e de quantificação da extração assistida por ultrassom com a digestão por via úmida para a determinação de Mn, Zn e Mg em farinha de chia por FAAS.

<b>Limites de detecção e de quantificação (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Metal</b>	<i>Extração Assistida por Ultrassom</i>		<i>Digestão por Via Úmida</i>		<i>Faixa linear (mg L<sup>-1</sup>)</i>
	<i>LD</i>	<i>LQ</i>	<i>LD</i>	<i>LQ</i>	
<b>Mn</b>	0,016	0,054	0,072	0,240	0,3 - 1,5
<b>Zn</b>	0,035	0,118	0,092	0,308	0,2 - 1,0
<b>Mg</b>	0,019	0,064	0,056	0,186	0,1 - 0,8

Os valores de LQ obtidos para o método de extração assistida por ultrassom variaram de 0,064 a 0,118 mg L<sup>-1</sup> seguindo a sequencia Mn < Mg < Zn, e o mesmo comportamento foi observado para os valores de LD, os quais variaram de 0,016 a 0,035 mg L<sup>-1</sup>. Como os valores obtidos foram inferiores ao primeiro ponto das curvas analíticas (Tabela 5) assume-se que os analitos podem ser quantificados com precisão e exatidão adequadas na faixa linear das concentrações investigadas. Por outro lado, a digestão por via úmida, adotada como método de referência apresentou valores de LD e LQ superiores aos obtidos pelo método proposto de extração assistida por ultrassom.

Os valores de LD e de LQ obtidos para a digestão por via úmida para Zn e Mg foram superiores ao primeiro ponto das curvas analíticas destes íons metálicos, demonstrando a dificuldade da digestão por via úmida em quantificar estes analitos em baixas concentrações na faixa linear estudada. As possíveis razões para este comportamento são a utilização de quantidades elevadas de reagentes e de um tempo longo de aquecimento, o que pode levar a contaminação dos brancos analíticos e ao aumento dos limites de detecção e de quantificação.

É importante ressaltar que os limites de quantificação do método proposto de extração assistida por ultrassom apresentaram valores inferiores aos do método de referência possivelmente por limitar o uso de reagentes em altas concentrações e por não utilizar peróxido de hidrogênio, diminuindo a possibilidade de contaminação dos brancos analíticos e aumentando a sensibilidade da metodologia.

### **4.2.3. Exatidão e Precisão**

Na Tabela 14 são apresentadas as concentrações médias e os desvios padrão dos teores de Mn, Zn e Mg nas amostras de sementes e farinhas de chia utilizando o método de referência (digestão por via úmida) e o método proposto de extração assistida por ultrassom. Testes estatísticos como o teste-*t* pareado, a regressão linear e o teste-*F* de comparação de variâncias ponderadas foram aplicados aos teores dos íons metálicos investigados obtidos nas amostras de sementes e farinhas de chia por FAAS.

**Tabela 14.** Teores médios e respectivos desvios padrão de Mn, Zn e Mg nas amostras de sementes e farinhas de chia obtidos pelo emprego de métodos de preparação de amostras distintos (método de referência e extração assistida por ultrassom).

Concentração média ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ DP <sup>a,b</sup>						
Amostra	Mn		Zn		Mg	
	<i>Digestão por Via Úmida</i>	<i>Extração Assistida por Ultrassom</i>	<i>Digestão por Via Úmida</i>	<i>Extração Assistida por Ultrassom</i>	<i>Digestão por Via Úmida</i>	<i>Extração Assistida por Ultrassom</i>
SC1	65,32 $\pm$ 4,11	63,09 $\pm$ 0,73	44,43 $\pm$ 0,51	45,83 $\pm$ 0,60	4283 $\pm$ 179	4430 $\pm$ 320
SC2	34,16 $\pm$ 0,24	34,26 $\pm$ 0,16	72,58 $\pm$ 3,23	83,04 $\pm$ 3,19	3898 $\pm$ 426	3600 $\pm$ 5,4
SC3	61,22 $\pm$ 0,60	63,16 $\pm$ 0,46	80,52 $\pm$ 6,47	70,57 $\pm$ 0,34	4048 $\pm$ 42	4072 $\pm$ 58
SC4	26,11 $\pm$ 0,45	28,53 $\pm$ 0,11	77,40 $\pm$ 0,61	75,02 $\pm$ 0,02	3384 $\pm$ 25	3425 $\pm$ 58
SC5	36,97 $\pm$ 0,04	40,49 $\pm$ 0,31	54,86 $\pm$ 1,20	76,69 $\pm$ 1,46	4741 $\pm$ 0,8	4456 $\pm$ 250
SC6	34,22 $\pm$ 0,04	38,01 $\pm$ 0,26	55,48 $\pm$ 0,36	55,88 $\pm$ 1,20	4032 $\pm$ 86	3615 $\pm$ 29
SC7	95,58 $\pm$ 3,14	82,58 $\pm$ 0,52	79,30 $\pm$ 1,51	77,81 $\pm$ 1,54	4371 $\pm$ 46	4454 $\pm$ 2,4
SC8	49,19 $\pm$ 1,40	47,49 $\pm$ 0,53	74,71 $\pm$ 0,16	74,20 $\pm$ 4,83	3877 $\pm$ 20	3819 $\pm$ 104
FC1	49,98 $\pm$ 0,54	52,54 $\pm$ 0,67	52,51 $\pm$ 2,55	55,85 $\pm$ 0,65	4425 $\pm$ 8,0	4450 $\pm$ 47
FC2	72,75 $\pm$ 1,52	71,80 $\pm$ 0,44	79,30 $\pm$ 1,51	77,81 $\pm$ 1,54	3416 $\pm$ 81	3452 $\pm$ 67
FC3	65,33 $\pm$ 1,07	73,40 $\pm$ 0,19	79,86 $\pm$ 1,49	76,78 $\pm$ 0,19	4312 $\pm$ 268	4369 $\pm$ 46
FC4	42,35 $\pm$ 0,36	42,29 $\pm$ 0,01	45,85 $\pm$ 0,47	49,09 $\pm$ 0,36	4035 $\pm$ 42	4154 $\pm$ 32
FC5	30,98 $\pm$ 0,11	32,98 $\pm$ 0,29	93,64 $\pm$ 1,00	98,79 $\pm$ 0,91	3648 $\pm$ 151	3390 $\pm$ 69

<sup>a</sup> Os desvios padrão foram calculados a partir de duplicatas de cada um dos métodos de preparo de amostra.

#### 4.2.3.1. Precisão

Para verificar a confiabilidade do método de extração assistida por ultrassom foi realizado o estudo de precisão por meio da comparação das variâncias ponderadas do método de referência (digestão por via úmida) e da extração assistida por ultrassom, aplicando-se um teste- $F$  apropriado, utilizando-se diferentes amostras de sementes e de farinhas de chia. Além disso, foi avaliada a repetitividade expressa em desvios padrão relativos (RSD (%)), e os resultados são apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Dados do estudo de precisão (teste- $F$  e intervalos de confiança) do método de referência e a extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em farinhas e sementes de chia

Metal	Estimativas de Precisão			Repetitividade	
	$F_{calculado}$	$p$ -valor	Intervalo de confiança	(RSD%) Experimental	(RSD%) Recomendado
Mn	14,70	0,000	4,7 -45,8	1,05	5,30
Zn	1,58	0,420	0,5-4,9	3,80	5,30
Mg	1,22	0,729	0,4-3,8	3,25	3,70

$$F_{critico} (0,05;13;13) = 3,18$$

Uma das formas de avaliar a precisão adotada neste estudo consistiu na aplicação de um teste- $F$  que considera a razão entre as variâncias amostrais ponderadas do método proposto e do método de referência, juntamente com os intervalos de confiança para a razão entre as variâncias (WENIMONT, 1985; CANO et al., 2007; MILLER e MILLER, 2002). Os resultados da análise do teste- $F$  sugerem que não existem diferenças significativas entre a precisão do método proposto em relação a do método de referência para a determinação dos íons metálicos Zn e Mg, já que os valores de  $F_{calculado}$  foram inferiores ao valor de  $F_{critico}$ , com  $p > 0,05$ . Por outro lado, o resultado do teste- $F$  para a determinação de Mn sugere que existem diferenças significativas entre a precisão do método de referência (digestão por via úmida) e o método proposto (extração assistida por ultrassom), pois  $F_{calculado} > F_{critico}$  com  $p < 0,05$  e o intervalo de confiança para a razão das variâncias ponderadas apresentou limite inferior maior que 1,0 (Tabela 15).



Para verificar se a extração assistida por ultrassom seria um método de preparo de amostra mais preciso que o método de referência (digestão por via úmida) foi aplicado o teste- $F$  de comparação das variâncias ponderadas monocaudal (MILLER e MILLER, 2002). Os resultados obtidos demonstraram que a extração assistida por ultrassom tem menores desvios padrão ponderados do que o método de referência, pois  $F_{calculado} = 14,70$  é maior do que o valor do  $F_{critico (0,05;13,13)} = 2,62$  com  $p < 0,05$ . Desta forma, pode-se confirmar que o método de extração assistida por ultrassom apresenta precisão adequada para a determinação de Zn e Mg e melhor precisão para a determinação de Mn em amostras de sementes e farinhas de chia por FAAS. As diferenças obtidas entre os métodos de preparo de amostra podem ser explicadas pelo fato da digestão por via úmida apresentar perdas do analito por volatilização devido ao elevado tempo de digestão e à necessidade de grandes volumes de reagentes aumentando os desvios padrão do método de referência (BRANDÃO, 2010).

As estimativas de repetitividade também foram consideradas apropriadas para todos os íons metálicos estudados, uma vez que os valores encontrados de RSD (%) foram inferiores aos valores recomendados pela AOAC na faixa das concentrações investigadas (AOAC, 2012). Desta forma, pode-se sugerir que o preparo de amostra utilizando a extração assistida por ultrassom apresenta precisão adequada para a determinação de Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e farinhas de chia por FAAS.

#### **4.2.3.2. Exatidão**

Neste estudo a exatidão foi avaliada por meio da comparação dos teores de Mn, Zn e Mg obtidos pelo método de referência com os valores obtidos pela extração assistida por ultrassom, realizando-se a aplicação de testes estatísticos (teste- $t$  pareado e a análise de regressão linear) no nível de 95% de confiança. Na Tabela 16 são apresentados os dados obtidos a partir da comparação dos métodos nas diferentes amostras de sementes e farinhas de chia.

**Tabela 16.** Resultados da avaliação da exatidão do método de extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e farinhas de chia.

<i>Teste-t pareado</i>			
<b>Metal</b>	<i>t calculado</i>	<i>p-valor</i>	<i>Intervalos de confiança para a determinação das médias</i>
<b>Mn</b>	0,51	0,617	(-2,15) - 1,51
<b>Zn</b>	1,38	0,179	(-5,27) - 1,04
<b>Mg</b>	1,38	0,178	(-29,4) - 150,1

<sup>a</sup>  $t_{critico} (0,025; 13) = 2,160$

A análise do teste-*t* pareado (Tabela 16) sugere que não existem diferenças significativas no nível de 95% de confiança entre os teores de Mn, Zn e Mg determinados pela extração assistida por ultrassom em relação aos resultados obtidos pelo método de referência, pois os valores de  $t_{calculado}$  foram menores do que o valor de  $t_{critico}$  com valores de  $p > 0,05$ .

A exatidão do método de preparo de amostra usando a extração assistida por ultrassom também foi avaliada pela técnica de regressão linear aplicada aos resultados apresentados na Tabela 16. Esta técnica permite identificar a presença de erros aleatórios e sistemáticos, os quais podem afetar a exatidão dos métodos (MILLER e MILLER, 2002).

Os resultados apresentados na Tabela 17 demonstraram que os modelos lineares para Mn, Zn e Mg são adequados e os teores destes íons metálicos apresentam uma correlação linear entre os métodos de preparo de amostra avaliados (método de referência e a extração assistida por ultrassom), o que pode ser confirmado pelos elevados valores de  $F_{regressão}$ , que variaram entre 212,6 e 36,82 com valores de  $p < 0,05$ .

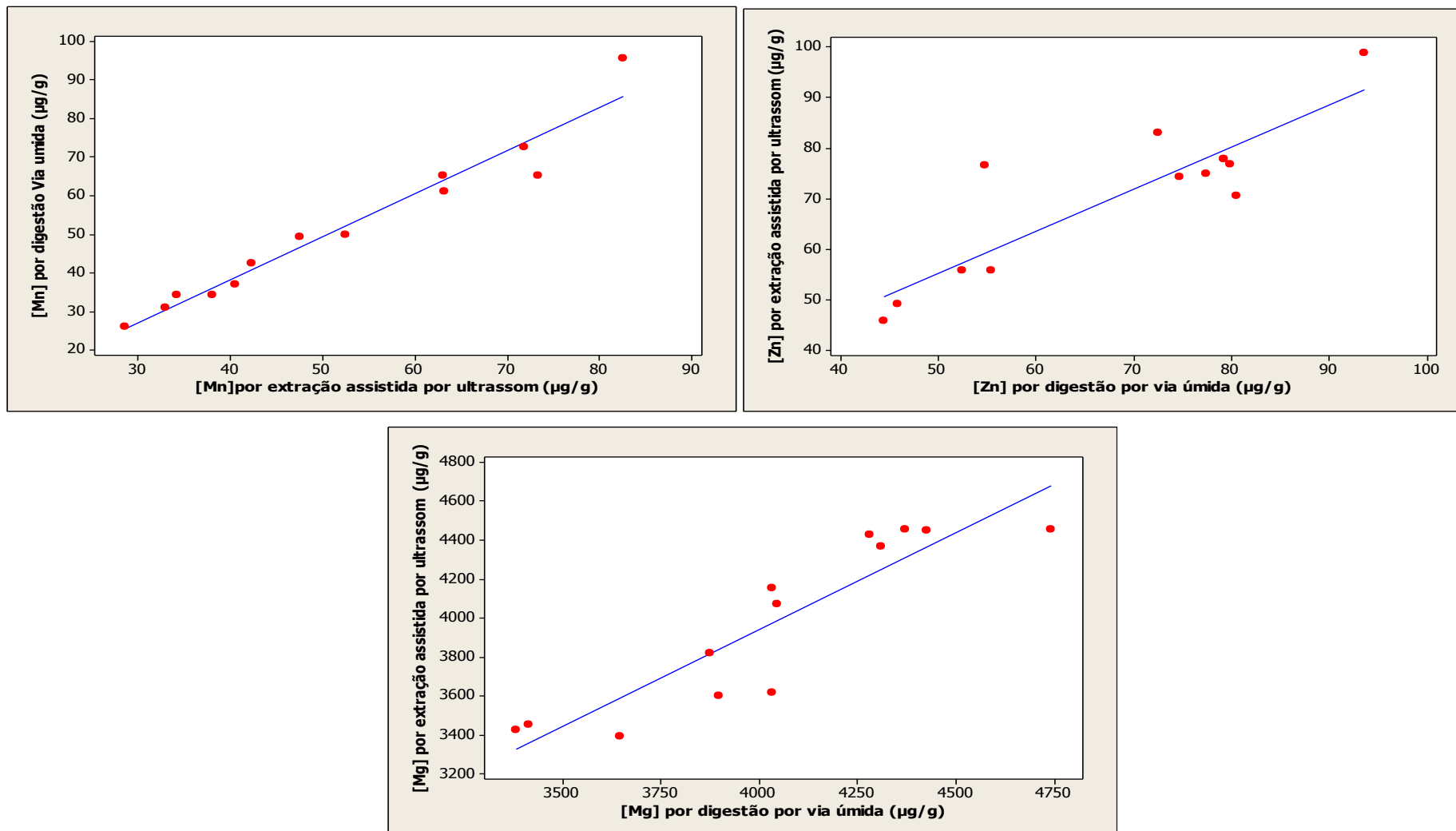
**Tabela 17.** Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em chia por FAAS

Metal	$F_{regressão}$	$p$ -valor	Coefficiente da reta de regressão $\pm$ Erro padrão	$t_{observado}$	$p$ -valor
Mn	212,6 <sup>a</sup>	0,000	Inclinação: 1,12 $\pm$ 0,08	14,58 <sup>b</sup>	0,000
			Intercepto: -6,41 $\pm$ 4,15	1,55 <sup>b</sup>	0,150
Zn	36,82 <sup>a</sup>	0,000	Inclinação: 0,93 $\pm$ 0,15	6,07 <sup>b</sup>	0,000
			Intercepto: 3,13 $\pm$ 10,99	0,28 <sup>b</sup>	0,781
Mg	49,81 <sup>a</sup>	0,000	Inclinação: 0,99 $\pm$ 0,14	7,06 <sup>b</sup>	0,000
			Intercepto -43,8 $\pm$ 572,1	0,08 <sup>b</sup>	0,940

<sup>a</sup> $F_{crítico(0,05;1,13)} = 4,67$ ; <sup>b</sup> $t_{crítico(0,025;13)} = 2,160$

Para verificar a significância dos coeficientes da regressão linear (intercepto e inclinação) foi aplicado um teste- $t$  aos mesmos, no mesmo nível de confiança. Os resultados obtidos indicaram que as inclinações das retas de regressão para todos os íons metálicos investigados são estatisticamente iguais a 1,0, pois os valores de  $t_{calculado}$  foram maiores do que os valores de  $t_{crítico}$  com valores de  $p < 0,05$  e são estatisticamente iguais a 1,0.

A avaliação do intercepto sugere que não havia significância estatística destes, já que os valores de  $t_{calculado}$  foram menores do que os valores de  $t_{crítico}$  com valores de  $p > 0,05$ . Estes resultados comprovam que ambos os métodos de preparo de amostras (digestão por via úmida e a extração assistida por ultrassom) não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos (Figura 11).



**Figura 11.** Comparação por regressão linear dos métodos de preparo de amostra de digestão por via úmida e da extração assistida por ultrassom para os metais Zn, Mn e Mg em amostras de sementes e farinhas de chia.

A Figura 11 ilustra uma relação funcional linear entre os métodos de preparo de amostra (digestão por via úmida e a extração assistida por ultrassom) aplicados para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e farinhas de chia por FAAS. A partir destes resultados pode-se sugerir que a extração assistida por ultrassom, como método de preparo de amostra, apresenta uma boa exatidão para determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e farinhas de chia por FAAS.

## 5. CONCLUSOES

De modo geral, a extração assistida por ultrassom como método de preparo de amostra para a determinação de Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e farinhas de chia por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), mostrou-se adequada já que os parâmetros avaliados no estudo de validação (linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão) encontraram-se dentro dos critérios recomendados pela literatura. Além disso, planejamento fatorial permitiu a otimização do método de extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e farinhas de chia por FAAS, estabelecendo como condições ótimas um tempo de extração igual a 30 minutos e uma concentração de solução extratora de HNO<sub>3</sub> 5% (v/v). No entanto, para a determinação dos íons metálicos Fe e Ca verificou-se que ainda é necessário otimizar as condições de concentração da solução extratora e do tempo de extração, requerendo estudos mais aprofundados.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a extração assistida por ultrassom é vantajosa em relação ao método de referência (digestão por via úmida) devido principalmente a sua simplicidade, baixo custo operacional e impacto ambiental para análise de Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e farinhas de chia por FAAS. É importante ressaltar que a extração assistida por ultrassom é uma metodologia muito mais rápida já que só faz uso de 30 minutos de extração para a determinação de Mn, Zn e Mg em amostras de chia comparada com o método de referência que utiliza 8 horas de digestão. Além disso, este método de preparo de amostra apresenta uma valiosa contribuição para a química verde, pois faz uso de pequenos volumes de reagentes e não faz uso de temperatura, gerando menos resíduos perigosos e tóxicos para o ambiente e proporcionando maior segurança para o analista.

Finalmente, a extração assistida por ultrassom produz resultados precisos e exatos, fatos que tornam atrativa a implantação desta metodologia de preparo de amostra em laboratórios de controle de qualidade, e de órgãos de fiscalização de alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS

ALEIXO, P.C.; JUNIOR, D.S.; TOMAZELLI, A.C.; RUFINI, I.A.; BERNDT, H.; KRUG, F.J. Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. **Analytica chimica acta**, v.512, p. 329-337, 2004.

ALMEIDA, L.C.; NAVES, M.M. Biodisponibilidade de ferro em alimentos e refeições: aspectos atuais e recomendações alimentares. **Pediatria moderna**, v. 38, n. 6, p. 272-278, 2002.

ANDOLFATTO, S. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação direta de Mn, Zn, Fe e Mg em melado e melaço de cana utilizando a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)**. Guarapuava, 2016. 90f. Dissertação (mestrado em química aplicada)- Universidade Estadual do Centro-Oeste.

ANDRADE, C.K. de; ANJOS, V.E. dos A.; FELSNER, M.L.; TORRES, Y.R.; QUINAIA, 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.

ANDRADE, J.K. de. **Otimização e validação de metodologias analíticas para determinação de 5-(hidróximetil)-2-furaldeído (HMF) em alimentos com altos teores de açúcares**. Guarapuava, 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual do Centro-Oeste.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Guidelines for standard method performance requirements**, 2012.

ARAIN, M.B.; KAZI, T.G.; JAMALI, M.K.; JALBANI, N.; AFRIDI, H.I.; SARFRAZ, R.A.; SHAH, A.Q. Determination of toxic elements in muscle tissues of five fish species using ultrasound- assisted pseudodigestion by electrothermal atomic absorption spectrophotometry: optimization study. **SPECTROMETRY LETT**, v. 40, p. 861-878, 2007.

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

AREAL, R. **Nutrición para el exito del deportista**. Barcelona: Editorial Reverte s.a, 1988, 582.

ASCHNER, J.L.; ASCHNER, M. Nutricional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspect of Medicine**, v. 26, p. 353-362, 2005.

ASCHNER, M.; GUILARTE, T.R.; SCHNEIDER, J.S.; ZHENG, W. Manganese. Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicology and Pharmacology**, v.221, p. 131-147, 2007.

ASHLEY, K.; ANDREWS, R.N.; CAVAZOS, L.; DEMANGE, M. Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 16, n. 10, p. 1147-1153, 2001.

AYERZA , R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica L.*). **Industrial Crops and Products**, v. 34,p. 2011366-1371,2011.

AYERZA, R. Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica L.*) genotypes. **Journal of the american oil chemists society**, v. 87, p. 1161-1165, 2010.

AYERZA, R.; COATES, W. Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and alfa-linolenic content of three chia (*Salvia hispanica L.*) selections. **Industrial crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 321-324, 2009.

AYERZA, R.; COATES, W. Composition of chia ( *Salvia hispanica* ) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America.**Tropical science**, v. 44,p.131-135, 2004.

AYERZA, R.; COATES, W. Production potential of chia in northwestern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v.5, p. 229-233, 1996.

AYERZA, R. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica L.*) from five Northwestern locations in Argentina. **Journal of the American oil chemists society**, v. 72, p. 86-96, 1995.

AZEVEDO, R.; AFONSO, J.C. Elemento químico: Manganês. **Quimica nova na escola**, v. 34, n. 2, p. 103-105, 2012.

BARBAGALLO, M.; DOMINGUEZ, L,J.; GALIOTO, A.; PINEO, A.; BELVEDERE, M. Oral magnesium supplementation improves vascular function in elderly diabetic patients. **Magnesium Research**, v. 23, n. 3, p. 131- 7, 2010.

BARONI, T.R. **Caracterização nutricional e funcional da farinha de chia (*Salvia hispanica*) e sua aplicação no desenvolvimento de pães**. Piracicaba, 2013.113f. Dissertação (Mestrado em ciências)- Universidade de são Paulo.

BENDICHO, C.; DE LA CALLE, I.; PENA, F.; COSTAS, M., CABALEIRO, I.; LAVILLA, I. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50-60, 2012.

BOCCIO, J.; SALGUEIRO, J.; LYSIONEK, A.; ZUBILLAGA, M.; GOLDMAN, C.; WEILL, R.; CARO, R. Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. **ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICIÓN**, v. 53, n. 2, p. 1-29, 2003.

BOLAÑOS, D.; MARCHEVSKY, E.J.; CAMIÑA, J.M. Elemental Analysis of Amaranth, Chia, Sesame, Linen, and Quinoa Seeds by ICP-OES: Assessment of Classification by Chemometrics. **Food Analytical Methods**, 10 jun. 2015.

BORNHORST, J.; EBERT, F.; HARTWIG, A.; MICHALKE, B.; SCHWERDTLE, T. Manganese inhibits poly (ADP-ribosylation) in human cells: a possible mechanism behind manganese- induced toxicity. **Journal of environmetal monitoring**, v.12, p. 2062-2069,



2010.

BRANDÃO, G.C.; AURELIANO, M.de O.; SAUTHIER, M.C.da S.; SANTOS, W.N.L. dos. 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**, n. 4, p. 855-858, 2012.

BRANDÃO, G.C. **Estratégias alternativas de preparo de amostra para a determinação de metais em alimentos por espectrometria de absorção atômica em chama**. Salvador, 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em ciências: química analítica).Universidade Federal de Bahia.

BRASIL. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008, de 04 de julho de 2011. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**.

BRASIL. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008, julho de 2007. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**.

BRASIL. ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução RDC 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteínas, Vitaminas e Minerais. **Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria**, 23 de setembro de 2005b.

BRASIL. ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos. **Diário Oficial da união**, 02 junho 2003.

BRESSON, J., FLYNN, A.; HEINONEN, M.; HULSHOF, K.; KORHONEN, H.; LAGIOU, P., LOVIK, M.; MARCHELLI, R., MARTIN, A.; MOSELEY, B.; PRZYREMBEL, H.; SALMINEN, S.; STRAIN, J., STROBEL, S.; TETENS, L.; BERG, H.; LOVEREN, H.; VERHAGEN, H. Opinion on the safety of chia seeds (*Salvia hispanica L.*) and ground whole chia seeds as a food ingredient. **European Food Safety Authority**, v. 996, n. 9, p. 1-26, 2009.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validacao de metodos analiticos: estrategia e discussao. **Pesticidas: R, Ecotoxicol, e meio ambiente**, v. 13,p. 129-146, 2003.

BRITO, N.M. **Residuos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicacao**. São paulo, 2001. Dissertacao (Mestrado em quimica Analitica)- Universidade estadual paulista.

BROEKAERT, J.C.A. **Analytical atomic spectrometry with flames and plasma.**weinheim:Wiley-VHC, 2001. p.148.

**BUSILACCHI, H.; QUIROGA, M.; BUENO, M.; DI SAPIO, O.; FLORES, V.; SEVERIN, C. EVALUACIÓN DE SALVIA HISPANICA L. CULTIVADA EN EL SUR DE SANTA FE (REPÚBLICA ARGENTINA). CULTIVOS TROPICALES, V. 34, N. 4, P. 55–59, 2013**

CAHILL, J. Genetic diversity among varieties of Chia (*Salvia hispanica* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, n. 7, p. 773–781, 2004.

CAHILL, J.P.; PROVANCE, M.C. Genetics of qualitative traits in domesticated chia (*salvia hispanica* L.). **The journal of heredity**, v.93, n.1 .p.52-55 , 2002.

CALDEIRA, D.; VILARDO, L. **Alimentos funcionais: A prevenção começa na mesa.** Pandorga: São Paulo, 2015.p.146.

CALNE, N.S.; CHU, N.S.; HUANG, C.C.; LU, C.S.; OLANOW, W. Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology*, v. 44, p. 1583-1586, 1994.

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, p. 328-332, 2007.

CAPELO, J.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the Ultrasonic Solid-Liquid Extraction for elemental analysis (total content) by ETAAS. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, p. 225-232, 2005.

CAPITANI, M..I.; SOPOTORNO, V.; NOLASCO, S.M.; TOMÁS, M.C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. **Food Science and Technology**, v. 45, p. 94-102, 2012.

CARDOSO, M.H.W.M.; GOUEVÊA, A.V.; NÓBREGA, A.W.; ABRANTES, S.M.P. Validacao de metodo para determinacao de Residuos de Agrototoxicos em Tomate: uma experiencia laboratorial. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.63-72, 2010.

CEFLA, K.O. **Diseño de una planta para la extraccion del aceite vegetal comestible de las semillas de chia (*salvia hispanica* L.) mediante prensado.**Quito, 2015.158f. Dissertacao (ingeniero agroindustrial)-Escuela politecnica nacional.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. 1º. Ed. Rio de janeiro: Editora Interciencia, 2000. 606p.

COATES, W. **Chia: the complete Guide to the ultimate superfood.** Sterling Publishing Eds. New York, 2002.p 190

COELHO, M.S.; SALAS-MELLADO, M.M. Rewiew: Chemical composition, functional

properties and technology applications of chia (*Salvia hispanica L*) seed in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 259-268, 2014.

COL, J.A. da. **Desenvolvimento de método analítico com emprego da espectrometria de absorção atômica da espectrometria de absorção atômica para a determinação de Cd, Fe, Pb e Zn em amostras de interesse alimentício**. São Carlos, 2008. 91f. Dissertação (mestrado em química)- Universidade Federal de São Carlos.

CUNHA, A.R.; UMBELINO, B.; CORREIA, M.L.; NEVES, M.F. Efeitos do magnésio sobre a estrutura e função vascular. **Revista do hospital universitário Pedro Ernesto, UERJ**, 2011.

CURRIE, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Analytica chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 105-126, 1999.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 297-335, 1980.

CHACKO, S.A.; SONG, Y.; NATHAN, L.; TINKER, L.; BOER, I.H. de.; TYLAVSKY, F.; WALLACE, R.; LIU, S. Relations of dietary magnesium intake to biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in an ethnically diverse cohort of postmenopausal women. **DIABETES CARE**, v. 33, n. 2, p. 304-310, 2010.

DALLMAN, P. Iron. Present knowledge in nutrition. Sixth edition, International Life Sciences Institute. ILSI. North America. 1990<sup>a</sup>.

DE LA CALLE, I.N.C.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasonically-Assisted single extraction testes for rapid assesment of metal extractability from Soils by TXRF. **Journal of hazardous materials**, v. 260, p. 202-209, 2013.

DE LA CALLE, I.; CABALEIRO, N.; COSTAS, M.; PENA, F.; GIL, S.; LAVILLA, C.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction of gold and silver from environmental samples using different extractants followed by electrothermal-atomic absorption spectrometry, **Microchemical journal**, v. 97, n. 2, p. 93-100, 2011.

DE LA CALLE, I.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Analytical evaluation of a cup-horn sonoreactor used for ultrasound-assisted extraction of trace metals from troublesome matrices. **SPECTROCHIMICA ACTA PART B**, v. 64, p. 874-883, 2009.

DENDOUGUI, F.; SCHWEDT, G. In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food sample. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 4, p. 409-415, 2004.

DI SAPIO, O.; BUENO, M.; BAROLO, M.; BUSILACCHI, H.; QUIROGA, M.; SEVERIN, C. "Quality tests of *Salvia hispanica L.* (Lamiaceae) fruits marketed in the city

of Rosario (Santa Fe province, Argentina)", **Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales e aromáticas**, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2010.

DE PAULA, C.E.R.; CALDAS, L.F.S.; BRUM, D.M.; CASSELLA, R.J. Development of a focused ultrasound-assisted extraction method for the determination of trace concentration of Cr and Mn in pharmaceutical formulations by ETAAS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 74, n. X, p. 284-290.

DE VALLEJUELO, S.Fdez. O.; BARRENA, A.; ARANA, G.; DIEGO, A. de. MADARIAGA, J.M. Ultrasound energy focused in a glass probe: An approach to the simultaneous and fast extraction of trace elements from sediments. **Talanta**, v. 80, p. 434-439, 2009.

DOMINGUEZ, B.M.; GOMEZ, M.V.; LEON, F.R. Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. **Sociedad latinoamericana de nutrición**, v. 52, n. 3, 2002.

DUBOIS, V.; BRETON, S.; LINDER, M.; FANNI, J.; PAEMENTIER, M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. **European Journal of Lipid science and Technology**, v. 109, n. 7, p.710-732, 2007.

ERDMAN, J.W. Oilseed phytates: nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 56, n. 8, p. 736-741, 1979.

ERICKSON, K.M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. Manganese Neurotoxicity: A Focus on the Neonate. **Pharmacol Therapeut**, v. 113, n. 2, p. 369-377, 2007.

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

FEINBERGA, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Analytica chimica Acta**, v.391, p.239-252, 1999.

FERNÁNDEZ-COSTAS, C.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasonic extraction-ozonation sequential simple treatment for the determination of arsenic in environmental certified reference materials by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **Spectroscopy letters**, v. 39, n. 6, p. 713-725, 2006.

FERNANDES, J.B.; FREIRE,H. Uma revisão sobre o zinco. **Ensaio e ciência: ciências biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 207-222, 2011.

FERREIRA, S.L.C; MIRO,M.; SILVA, E.G.P da.; MATOS, G.D.; REIS, P.S. dos.; BRANDAO, G.C.; SANTOS, W.N.L. dos.; DUARTE, A.T.; VALE, M.G.R.Ç.; ARAUJO, R.G.O. Slurry Sampling- Na Analytical strategy for the determination of metals and

metalloids by Spectroanalytical Techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 1, p. 44-62, 2010.

FERREIRA, S.C. **Avaliação das propriedades gelificantes da farinha de chia (Salvia hispanica) Desenvolvimento de novas aplicações culinárias**. Lisboa, 2013. 111f. Dissertação (Mestrado em ciências gastronómicas)-Universidade de Lisboa.

FERREIRA, B.L.; CHAVES, E.S.; VIALICH, J.; SAUER, E. Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.17, n.3, p. 236–242, 2014.

FERREIRA, M. A. **Otimização e validação de metodologia 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. 128f. Dissertação (Mestrado em química aplicada)-Universidade Estadual do Centro-Oeste.

FREITAS, P.C. de.; CARVALHO, R.M.de.; SILVA, J.S.A.; PRADO, T.; DUARTE, E.R.; FRESCURA, V.L.A.; CHAVES, E.S. Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: uma comparação em espectrometria de massa com plasma indutivamente. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 1158-1164, 2014.

FREIRE, C.A. de L.; CHARNET, E.M.R.; BONVINO, H.; CHARNET, R. **Análise de modelos de regressão linear**. Campinas: Editora Unicamp, 1999.

FILGUEIRAS, A.V.; CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 53, p. 433-441, 2000.

FIOREZE, M.; SANTOS, E.P.de. SCHMACHTENBERG, N. Processos oxidativos avançados: fundamentos e aplicação ambiental. **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental-REGET**, v. 18, n. 1, p. 79-91, 2014.

FIORINI, L.S. DOSSIÊ: OS MINERAIS NA ALIMENTAÇÃO. **FOOD INGREDIENTS BRASIL**, v. 4, p. 48-65, 2008.

FLORES, E.M.M.; BARIN, J.S. MESKO, M.F., KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels- A brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, n. 9, p.1051-1064, 2007.

FLORES, E.M.M.; KRUG, F.J.; BARIN, J.S.; ARRUDA, M.A. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Brasil: UFSM, 2006. Cap. 7, p. 204-224.

GALLAGHER, M.L. INGESTÃO: Os Nutrientes e seu Metabolismo. In: MAHAN, L.K.;

STUMP-ESCOTT, S.; RAYMOND, J.L. Krause: Alimentos, Nutrição e dietoterapia. Brasil: São Paulo: Elsevier, 2013. Cap. 3, p. 105-117.

GARCIA, F.E.; MORALES, M.O.; SANCHEZ, D.P. El calico en el desarrollo de alimentos funcionales. **Revista Lasallista de investigación**, v.8, n.1, p. 104-116, 2011.

GEDANKEN, A. Making the Hospital a safer place by the sonochemical coating of the fabrics with antibacterial and antibiofilm nanoparticles. San Francisco, 2014. 62 transparências. Disponível em: <http://www.global-summit.com/speaker-pdfs/2014/aharon-gedanken-bar-ilan-university-israel.pdf>. Acesso em: 17 de outubro de 2016.

GRILO, C. **Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metaloides em amostras biológicas**. Lisboa, 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em medicina legal e ciências forenses)- Universidade de Lisboa.

GONZALEZ, G. **PROYECTO UTF/ARG/017/ARG, 2014**. Disponível em < [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/rlc/utf017arg/valles\\_calchaquies/08.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/rlc/utf017arg/valles_calchaquies/08.pdf) > Acesso em 12 novembro 2015.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A.; ASUERO, A.G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, n. 3, p. 729–736, 1999.

GROMBONI, C.F.; CARAPELLO, R.; PEREIRA-FILHO, E.R.; ARAUJO, A.R. 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.

GROMBONI, C.F.; FERREIRA, A.G.; KAMOGAWA, M.Y.; DE ARAUJO NOGUEIRA, A.R. Avaliação da reação foto-Fenton na decomposição de resíduos de carrapaticida. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 264–267, 2007.

GUIOTTO, E.N.; IXTAINA, V.Y.; TOMAS, M.C.M.; NOLASCO, S.M. Moisture-Dependent Engineering Properties of Chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. In: MUZZALUPO, I. Agricultural and Biological Sciences. **Food Industry**. INTECH, 2013. Cap.17, p. 381- 397.

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

HAMBIDGE , K.M.; MILLER, L.V.; WESTCOTT, J.E.; KREBS, N.F. Dietary reference intakes for Zinc may require adjustment for phytate intake based upon model predictions. **Nutrient physiology, metabolism, and nutrient-nutrient interactions**, v. 138, n. 12, p. 2363-2366, 2008.

HARRIS, D. **ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO**. México D.F: GRUPO EDITORIAL IBEROAMERICA, 2007. 582p.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. GOODMAN E GILMANS THE PHARCOLOGICAL BASIC OF THERAPEUTICS. Mc GRAW-HILL. USA: NEW YORK, 2001.

HAZELL, T. Minerals in Foods: Dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability. In: Bourne, G.H. Minerals in Food and Nutritional Topics. Inglaterra: Norwich: World review of nutrition and dietetics, KARGER, 1985. Cap. 46, p. 1-123.

HERNANDEZ, J.A; MIRANDA, S. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CHÍA ( *Salvia hispanica* ) MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CHÍA ( *Salvia hispanica* ).**Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 31,n.2, p. 105–113, 2008.

HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis-facts and traps. **Talanta**, v. 54, n. 6, p. 1021-1038, 2001.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, p. 96-105, 1999.

HURRELL, R.F. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 9, p. 2973S–7S, 2003.

HWANG, S.S.; PARK, J.S.; NAMKOONG, W. Ultrasonic-assisted extraction to release heavy metals from contaminated soil. *Journal of industrial and engineering chemistry*, v. 13, n. 4, p. 650-656, 2007.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HORMOSISATION. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B** (CPMP/ICH/281/96), 1996.

IXTAINA, V.Y.; MARTINEZ, M.L.; SPOTORNO, V.; MATEO, C.M.; MAESTRI, D.M.; DIEHL, B.W.K ; NOLASCO, S.M.; TOMAS, M.C. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 166–174, 2011.

IXTAINA, V.Y.; NOLASCO, S.M.; TOMÁS, M.C. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n.3, p. 286-293, 2008.

JUNIOR, D.S.; KRUG, F.J.; KORN, M. Extrações assistidas por ultrassom. In: KRUG. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Brasil: rio grande do sul: Francisco Jose Krug, 2006. Cap. 3.3, p. 65-84.

KASTENMAYER, P. **Análisis de minerales y elementos traza en alimentos 2007**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s22.htm>>. Acesso em: 19 em novembro de 2015.

KAZI, T.G.; AFRIDI, H.I.; KAZI, G.H.; JAMALI, M.K.; ARAIN, M.B.; JALBANI, N. Evaluation of essential and toxic metals by ultrasound-assisted acid leaching from scalp hair samples of children with macular degeneration patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 369, p. 52-60, 2006.

KRASNODEBSKA-OSTREGA, B.; KACZOROWSKA, M.; GOLIMOWSKI, J. Ultrasound-assisted extraction for the evaluation of element mobility in bottom sediment collected at mining and smelting Pb-Zn ores area in Poland. **Microchimica Acta**, v. 154, p. 39-43, 2006.

KORN, M.G.A.; BOA MORTE, E.S. da; 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 determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.43, p.67-92, 2008.

KORN, M.; PEREIRA, M.G.; BORGES, S.S.; **Boletim da sociedade portuguesa de química** 2005, 96,51.

KRUG, FJ. **Métodos de preparo de amostra. Fundamento sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 6ª Edicao Revisada e Ampliada. Editorial: José Krug, 2006. 165p.

LAVILLA, I.; MOSQUERA, J.; MILLOS, J.; CAMESELLE, J.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction technique for establishing selenium contents in breast cancer biopsies by Zeeman-electrothermal atomic absorption spectrometry using multi-injection. **Analytica chimica acta**, v. 566, p. 29-36, 2006.

LAYRISSE, M.; COOK, J.D.; MARTINEZ, C.; ROCHE, M.; KUHN, I.N.; WALKER, R.B.; FINCH, C.A. **Food iron Absorption**: A comparison of vegetable and animal foods. *Blood*, v.33, n. 3, p. 348-352, 1969.

LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C.; ROCHE, M. Effect of interaction of various foods on iron absorption american. **Journal of clinical nutrition**, v. 21, p. 1175-1183, 1968

LEITE, D.P. **Estudo de metodos para a determinação de As, Cd, Pb, Cr e Se em fertilizantes base organica para AAS e ICP- OES**. São paulo, 2015. 110f. Dissertacao (Mestrado em ciencias: quimicas)- universidade de sao paulo.

LIMA, A.F.; RICHTER, E.M.; MUÑOZ, R.A.A. Alternative Analytical Method for Metal Determination in Inorganic Fertilizers Based on Ultrasound-Assisted Extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1519–1524, 2011.

LINK, D.D.; KINGSTON, H.M.S. Use of Microwave-Assisted Evaporation for the Complete Recovery of Volatile Species of Inorganic Trace Analytes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 13, p. 2908-2913, 2000.



LUZ, L.P. **Estudo do Ultra-som como Técnica de extração de carvoes e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. Porto alegre, 1998. 98f. Dissertação (Mestrado em química)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MACHADO, I.; BERGMANN, G.; PISTÓN, M. Short communication A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry ( FAAS ). **Food Chemistry**, v. 194, p. 373–376, 2016.

MADURO, C.; VALE, G.; ALVES, S.; GALESIO, M.; SILVA, G. da. FERNANDEZ, C.; CATARINO, S.; RIVAS, M.; MOTA, A.; CAPELO, J.L. Determination of Cd and Pb in biological reference materials by electrothermal atomic absorption spectrometry: a comparison of three ultrasonic- based sample treatment procedures. **Talanta**, v. 68, p. 1156-1161, 2006.

MANUTSEWEE, N.; AEUNGMAITREPIROM, W.; VARANUSUPAKUL, P.; INYIM, A. Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after ultrasound-assisted acid leaching extraction. **Food chemistry**, v. 101, p. 817-824, 2007.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V. de.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E. de.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poli-insaturados Omega-3 e Omega-6: importância e ocorrência em alimentos, **Revista de nutrição**, v.19, n.6, p. 761-770, 2006

MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry ( MIP-OES ) following tetramethylammonium hydroxide ( TMAH ) solubilization. **Microchemical journal**, v. 76, p. 23–29, 2004

MATUSIEWICZ, H. Wet digestion methods. In: MESTER, Z.; STURGEON, R. Sample preparation for trace element analysis. Holanda: Amsterdam: Elsevier, 2003. Cap. 6, p.199-210.

MIGLIAVACCA, R.A.; SILVA, T.B. da.; VASCONCELOS, A.S. de.; MOURAO, W.F.; BAPTISTELLA, L.C. O CULTIVO DA CHIA NO BRASIL: FUTURO E PERSPECTIVAS, **Journal of agronomic sciences**,v. 3, n. especial, p.161-179, 2014.

MILLER, J.N.; MILLER, J.M. **Estadística y quimiometría para química analítica**. 5.ed. Madrid: Editorial Prentice Hall, 2002. 296p.

MILLIKAN, M. Nutritional metals in foods by AAS. In: MUHAMMAD, A.F. Atomic Absorption Spectroscopy, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/atomic-absorption-spectroscopy/nutritional-metals-in-foods-by-aas>. Acesso em: 14 de setembro de 2016.

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

MOHD ALI, N. KEONG YEAP, S.; YONG HO, W.; KEE BEH, B.; WEI TAN, S.; GUAN TAN, S. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p.1-5, 2012.

MONTEIRO, S.P.; RIBEIRO, L.A.R.; FONSECA, W.T.; TAKEUCHI, R.M.; SANTOS, A.L. Determinação de chumbo em águas de abastecimento utilizando filmes de Bismuto crescidos in situ sobre eletrodos de pasta de carbono. **Orbital: the electronic journal of chemistry**, v. 6, n. 1, p. 29-38, 2014.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista electronica de Farmácia**, v.3, n.2, p. 99-112, 2006.

MORAES, P.M.; LOUREIRO, V.R.; PADILHA, P.M. Determinação de fosforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. **Química nova**, v.32, n. 4, p.923-927, 2009.

MOSHA, T.C.; GAGA, H.E.; PACE, R.D.; LASWAI, H.S.; MTEBE, K. Effect of blanching on the content of antinutritional factors in selected vegetables. **Plantas Foods for Human Nutrition**, v. 47, n.4, p.361-367, 1995.

MOURÃO, W.; LEONARDO, J.; BAPTISTELLA, C. CHIA'S CULTIVATION IN BRAZIL: FUTURE AND PERSPECTIVES. **Journal of Agronomic Sciences**. v.3.n.especial, p. 161–179, 2014.

MUÑOZ, L.A.; COBOS, A.; DIAZ, O.; AGUILERA, J.A. Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. **Food Reviews International**, v. 29, n. 4, p. 394–408, 2013.

NASCENTES, C.C.; ARRUDA, M.A.Z.; NOGUEIRA, A.R.A.; NOBREGA, J.A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 64, n. 4, p. 912-917, 2004.

NASCENTES, C.; KORN, M.; ARRUDA, M.A.Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. **Microchemical Journal**, v.69, p. 37–43, 2001.

NATA. National Association of Testing Authorities. **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. Technical Note 17. Australia, 2012.

NEVES, R.C.F.; MORAES, P.M.; SALEH, M.A.D.; LOUREIRO, V.R.; SILVA, F.A.; BARROS, M.M.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.M.A.; PADILHA, P.M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. **Food Chemistry**, v.

113, n. 2, p. 679–683, 2009.

NOBREGA, J.A.; SANTOS, M.C.; SOUZA, R.A. de.; CADORE, S.; BARNES, R.M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. **SPECTROCHIMICA ACTA PARTE B**, v. 61, p. 465-495, 2006.

NOGUEIRA, R.F.P.; TROVO, A.G.; SILVA, M.R.A. da.; VILLA, R.D.; OLIVEIRA, M.C.de. Fundamentos e aplicaçoes ambientais dos processos Fenton e Foto-Fenton. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 400-408, 2007.

NOLAN, K.B.; DUFFIN, P.A.; MCWEENY, D.J. Effects of phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  (also  $Cd^{2+}$ ) solubilities in the presence of phytate. **Journal of the science of food agriculture**, v. 40, n. 1, p. 79-85, 1987.

NORLAILY, M.A.; SWEE K.Y.; WAN, Y.H.; BOON, K.B.; SHEAU, W.T.; SOON, T. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p.1-5, 2012.

NUNES, A.M.; ACUNHA, T.S.; ORESTE, E.Q.; LEPRI, F.G.; VIEIRA, M.A.; CURTIUS, A.J.; RIBEIRO, A.S. Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, p.1850-1857, 2011.

OLIVOS-LUGO, B.L.; VALDIVIA-LOPEZ, M.A.; TECANTE, A. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). **Food science and Technology international**, v. 17, n. 4, p. 938-976, 2010.

OLIVEIRA, E. de. 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.; ADEYEMO, A.O.; IDOWU, O.E.; OGABIELA, E.E. Cooper and Zinc content of Nigerian foods and estimates of the adult dietary intakes. **Food Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 89-95, 2001.

OZCAN, M.; AKMAN,S. Investigation of the effect of some inorganic salts on the determination of tin in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **SPECTROCHIMICA ACTA PARTE B**, v.55, p. 509-515, 2000.

PAPADOPOULOS, A.E.; FATTA, D.; LOIZIDOU, M. Development and optimization of dark Fenton oxidation for the treatment of Textile Wastewaters with high organic load. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, n.3, p. 558-563, 2007.

PAL, P.K.; SAMIL, A.; CALNE, D.B. Manganese neurotoxicity: a review of clinical

features, imaginig and pathology. **Neurotoxicology**, v. 20, p.227-238, 1999.

PEIRETTI, P.G.; GAI, F. Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica L.*) seed supplements. **Meat science**, v. 80, n. 4, p. 1116-1121, 2008.

PEREIRA, G.A.; GENARO, P.S.; PINHEIRO, M.M.; SZEJNFELD, V.L.; MARTINI, L.A. Calcio dietético- estratégias para otimizar o consumo. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 164-171, 2009.

PEREIRA, S.; FONSECA, L.P.; CAPELO, J.L.; ARMAS, T.; VILHEMA,F.; PINTO, A.P.; GONCALVES, M.L.S.; MOTA, A.M. Comparative study between probe focussed sonication and conventional stirring in the evaluation of cadmium and copper in plants. **Analytical and Bioanalytical chemistry**, v. 398, p. 2315-2324, 2010.

PERONICO, V.C.D.; RAPOSO, J.L. Ultrasound-assisted extraction for the determination of Cu, Mn, Ca and Mg in alternative oilseed crops using flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1287-1292, 2016.

PERONICO, V.C.D. **Desenvolvimento de procedimentos para o preparo ed amostra na determinação de macro- e micronutrientes em plantas oleginosas por espectrometria de absorcao atomica**. Dourados, 2014. 76p. Dissertacao (mestrado em quimica)- Universidade Federal Da Grande Dourados.

PIELOU, E.C. **The interpretation of Ecological Data: a primer on classification and ordination**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 262p.

PIMENTEL, B.M.V.; FRANCKI, M.; GOLLUCKE, B.P. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PLAAMI, S. Myoinositol phosphates: anaysis, contente in foods and effects in nutrition. **Lebensm Wiss u Technol**, v.30, p. 633.647, 1997.

PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound-assisted digestion : A useful alternative in sample preparation. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, p. 299–310, 2007.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 117-128, 2009.

QUIRRENBACH, H.R. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 24–32, 2009.

REYES-CAUDILLO, E.; TECANTE, A.; VALDIVIA-LOPEZ, M.A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 107, p. 656-663, 2008.

REYES, L.H.; RAHMAN, M.G.M.; FAHRENHOLZ, T.; KINGSTON, H.M.S. Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish. **Analytical bioanalytical chemistry**, v. 390, p. 2123-2132, 2008.

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, F.A. L. de.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R. da.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p.164-171, 2008.

RIBEIRO, A.S.; ARRUDA, M.A.Z.; CADORE, S. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio. Uma revisão crítica. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 396-405, 2002.

RODRIGUEZ, M.B.; MEGIA, S.; BAENA, B. Alimentos funcionales y nutrición optima: ¿cerca o lejos? **Revista española de salud pública**, v. 77, n. 3, p.317-331, 2003.

RODRIGUEZ, V.; MAGRO, E. **Bases de la alimentación humana**. 1. Ed. Madrid: Editora: Reverté, 2008

RONCADA, M.J.; WILSON, D.; NETTO, A.L.; NETTO, O.B.; KALIL, A.C.; NUNES, M.F.; OKANI, E.T. Hipovitaminose A em filios de migrantes nacionais em transito pela capital do Estado de São Paulo, Brasil. Estudo clinico-bioquímico. **Revista de saúde pública** v. 12, n. 3, p. 345- 350, 1978.

RUPFLIN, D.I.A. Caracterización de la semilla del Chan (*Salvia hispanica* L.) y diseño de um producto funcional que la contiene como ingrediente. **Revista 23 de la universidad del valle de Guatemala**, p. 43-49, 2011.

SAMPAIO, F.A.; CRUZ, K.J.C.; OLIVEIRA, A.R.S. de.; MARREIRO, D. do N. Influência da hipomagnesemia sobre a homeostase do ferro e estresse oxidativos no diabetes mellitus tipo 2. **Nutrire**, v. 40, p. 214-225, 2015.

SANTO, R.E. Principal componente analysis applied to digital image compression. **Instituto do cérebro-InCe, Hospital Israelita Albert Einstein- HIAE**, v. 10, n.2, p. 135-139, 2012.

SANTO, R.E. Utilização da análise de componentes principais na compressão de imagens digitais. **Einstein**, v. 12, n. 2, p. 135-139, 2012.

SCHWINGEL, A.; ARRUDA, M.A.; CADORE, S. Espectrometria de absorcao atomica com atomizacao eletrotermica em filamento de tungstenio. Uma re-visao critica. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 396-405, 2002.

SEGURA-CAMPOS, M.R.; CIAU-SOLIS, N.; ROSADO-RUBIO, G.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANACONA, D. Chemical and Functional Properties of Chia Seed ( *Salvia hispanica* L .) Gum. **International Journal of Food Science**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

SEGURA-CAMPO, M.R.; CIAU-SOLIS, N.; ROSADO-RUBIO, G.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANACONA, D. Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. **Agricultural Sciences**, v. 5, n.3, p. 220-226, 2014.

SEIDI, S.; YAMINI, Y. Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 938-976, 2012.

SENA, M.M. de. POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. Avaliacao do uso de métodos quimiométricos em analise de solos. **Quimica Nova**, v. 23, n. 4, p. 547-556, 2000.

SILVA, M.; SILVA, M.A. da. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de nutricao da Puccamp**, v. 12, n. 1, p. 5-19, 1999.

SILVA, C. S.de.; NUNES, A.M.; ORESTE, E.Q.; ACHUNHA, T.S.; VIERA, M.A.; RIBEIRO, A.S. Evaluation of sample preparation methods based on alkaline and acid solubilization for the determination of Na and K in meat samples by atomic spectrometric techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1623-1629, 2012.

SHRIVER, D.; ATKINS, P. **Quimica inorgânica**, Bookman companhia. Porto Alegre, 2008.

SKOOG, D.; WEST, D.M.; HOLLER, J.F.; CROUCH, S.R. **FUNDAMENTOS DE QUIMICA ANALÍTICA**. 8. Ed. Mexico: THOMSON EDITORES S.A, 2005, 852p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Deficiencia de vitamina A. Departamento cientifico de nutrologia da sociedade brasileira de pediatria, 2007.

SOLA-LARRAÑAGA, C.S.; NAVARRO-BLASCO, I. Optimization of a slurry dispersion method for minerals and trace elements analysis in infant formulae by ICP OES and FAAS. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p.1048-1055, 2009.

SOUZA, W.A.de.; VILAS BOAS, O.M. A deficiencia de vitamina A no Brasil: um panorama. **Pan American journal of public health**, v. 12, n. 3, p. 173-179, 2002.

SOUZA, L. **Avaliação da bioacessibilidade “in vitro” de macro e micro minerais em amaranto, multimistura e quinoa**. Fortaleza, 2015. 87f. Dissertacao (mestrado em quimica)- Universidade federal do Ceará.

SPINOLA, V.; LLORENT-MARTINEZ, E.J.; CASTILHO, P.C. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p.2-17, 2014.

STANISIC, S.M.; IGNJATOVIC, L.M.; MONOJLOVIC, D.D.; DOJCINOVIC, B.P. The comparison of sample extraction procedures for the determination of cations in soil by IC and ICP-AES. **Central European Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 481-491, 2011.

STUBBERUD, K-P.; ASTROM, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II validation. **Journal Chromatographic A**, v. 826, p. 95-102, 1998.

STREDRICK, D.L.; STOKES, A.H.; WORST, T.J.; FREEMAN, W.M.; JOHNSON, E.A.; LASH, L.H.; ASCHNER, M.; VRANA, K.E. Manganese-induced cytotoxicity in Dopamine-Producing cells. **NeuroToxicology**, v. 25, p. 543-553, 2004.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Simple and Fast Sample Preparation Procedure Prior to Multi-element Analysis of Slim Teas by ICP OES. **Food analytical methods**, v. 7, p. 2051-2063, 2014.

SULTANA, C. Oleaginous flax. In: KARLESKIND, A.; Wolff, J.P. Oils and Fats. France: Paris: Lavoisier Publishing, 1996. Cap. 1, p. 157-160.

TAGA, S.M.; MILLER, E.E.; PRATT, E.D. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists society**, v. 61, n.5, p. 928-931, 1984.

TAHAM, J.; SANCHEZ, J; GRANADILLO, V; CUBILLAN, H; ROMERO, R. Concentração of total Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Na, Pb, and Zn in commercial canned seafood determined by atomic spectrometric means after mineralization by microwave heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.4, p.910-915, 1995.

TAO, G.; WILLIE, S.N.; STURGEON, R.E.; Determination of inorganic Mercury in biological tissues by cold vapor atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide solubilization. **Journal of analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 1929-1931, 1999.

TAVARES, A.D. **Determinação de Cadmio e chumbo em alimentos e bebidas industrializadas por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica**. JOAO PESSOA, 2010. 98f. Dissertação (doutorado em química)-Universidade Federal da Paraíba.

TEXEIRA, C.P.; 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.

TOGNON, A.L. **“Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais”**. RIBERAO PRETO, 2012.128f.

Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade de São Paulo.

TOSCO, G. Os benefícios da “chia” em humanos e animais. **Atualidades ornitológicas**, n.119, p. 1-7, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R. WOOD, R. IUPAC interdivisional working party. Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), **Pure appl. Chem**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TREJOS, P.S. Digestión en horno de microondas para determinación de contenido de hierro y zinc totales en alimentos. **Tecnología en Marcha**, v. 25, n. 3, p. 96-100, 2012.

TRINDADE, W.M.; HORN, A.H.; RIBEIRO, E.V. Concentrações de metais pesados em sedimentos do Rio São Francisco entre Três Marias e Pirapora-MG: Geoquímica e classificação de risco ambiental. **Geonomos**, v. 20, n. 1, p. 64-75, 2012.

VALLEJUELO, S-F.O. de.; BARRENA, A.; ARANA, G.; DIEGO, A. de.; MADARIAGA, J.M. Ultrasound energy focused in a glass probe: Na approach to the simultaneous and fast extraction of trace elements from sediments. **Talanta**, v. 80, p. 434-439, 2009.

VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C.B. Modern methods for trace element determination. 1 ed. England: Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1997.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. Rio Grande do Sul, 2005. 215f. Monografia (especialização)- Universidade Federal de Santa Maria.

VIEIRA, E.C.; KAMOGAWA, M.Y.; LEMOS, S.G.; NOBREGA, J.A. de. NOGUEIRA, A.R. Decomposição de amostras de solos assistida por radiação micro-ondas: estratégia para evitar a formação de fluoretos insolúveis. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. V, 29. P. 547-553, 2005.

VOHRA, P.; GRAY, G.A.; KRATZAR, F.H. Phytic acid-metal complexes. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 120, n. 2, p. 447-454, 1995

WYATT, C.J.; TRIANA-TEJAS, A. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca and phytates in foods commonly consumed in northern Mexico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 2204-2209, 1994.

WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; POHL, P. Quality of the trace element analysis: sample preparation steps. **Wide Spectra of Quality Control**. Akyar, I. InTech, 2011.

WESLEY, R.J.; POCKLINGTON, D.; WALKER, R.F. Analytical quality assurance: a review. **Analyst**, v. 116, p. 975-990, 1991.

WERNIMONT, G.T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods**. 1. ed. Virginia: AOAC International, 1985. 183p.



WILLIAMS, M. **Nutrición para la salud, la condición física y el deporte**. Barcelona: Paidotribo. 2002.p. 160-165.

WHO Technical Report Series. WHO EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS. Thirty-second Report, Geneva 1992.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics, 2012**. Disponível em:[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44844/1/9789241564441\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44844/1/9789241564441_eng.pdf). Acesso em: 31 outubro 2015.

WOOD, R.J.; ZHENG, J.J. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans, **American journal of clinical nutrition**, v, 64, p. 1803-1809, 1997.

YEBRA-BIURRUN, M.C.; CESPON-ROMERO, R.M. Fast ultrasound-assisted extraction of copper, iron, manganese and zinc from human hair sample prior to flow injection flame atomic absorption spectrometric detection, **Analytical Bioanalytical chemistry**, v. 388, p. 711-716, 2007.

YEBRA-BIURRUN, M.C.; CANCELA-PEREZ, S. Continuous approach for ultrasound-assisted acid extraction-minicolumn preconcentration of chromium and cobalt from seafood sample prior to flame atomic absorption spectrometry. **Analytical science**, v. 23, p. 993-996, 2007.

ZHOU, JR. ERDMAN, J.W.J. Phytic acid in health and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 495-508, 1995.