

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ/UNICENTRO  
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

FRANCIELLY APARECIDA BAHIA

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM APLICADA A  
DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA (*Salvia hispanica*  
*L.*) POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Guarapuava

2019

FRANCIELLY APARECIDA BAHIA

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM APLICADA A  
DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA (*Salvia hispanica L.*) POR  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

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

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Lurdes Felsner  
Coorientador(a): Dr<sup>ª</sup> Camila Kulek de Andrade

Guarapuava

2019

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

B151e Bahia, Francielly Aparecida  
Extração assistida por ultrassom aplicada a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em chia (*Salvia hispanica L.*) por espectrometria de absorção atômica / Francielly Aparecida Bahia. -- Guarapuava, 2019.  
xii, 88 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, 2019

Orientadora: Maria Lurdes Felsner  
Coorientadora: Camila Kulek de Andrade  
Banca examinadora: Sueli Percio Quinaia, Elaine Regina Lopes Tiburtius

Bibliografia

1. Química. 2. Chia. 3. Metais. 4. F AAS. 5. Extração assistida por ultrassom. 6. Planejamento de misturas. 7. Validação de método. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

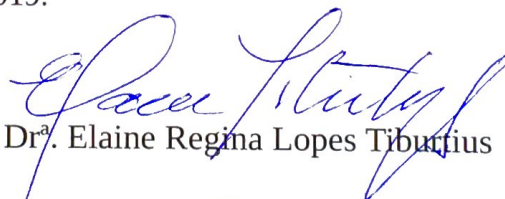
| CDD 542

**FRANCIELLY APARECIDA BAHIA**

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM APLICADA A DETERMINAÇÃO  
DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA (*Salvia hispanica L.*) POR ESPECTROMETRIA DE  
ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AAS)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.


Aprovado em 22 de agosto de 2019.



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Regina Lopes Tiburtius - (UEPG)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Pécio Quináia - (UNICENTRO)

  
Dr<sup>a</sup>. Camia Kulek de Andrade

co-orientadora

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lurdes Felsner

Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2019

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por permitir que tudo isso acontecesse em minha vida, e principalmente pela força para trilhar esse caminho.

À minha mãe Arlete Campos por todo apoio durante toda a minha vida.

À professora Dra. Maria Lurdes Felsner pela orientação, dedicação, gentileza e pela imensa paciência que teve durante esse tempo comigo, somente tenho a agradecer por todo ensinamento e apoio durante essa caminhada.

À minha Coorientadora Dra. Camila Kulek de Andrade por todo ensinamento, apoio e amizade.

Aos colegas do laboratório LabGati em especial a Vandressa Alves por toda parceria e ajuda nessa etapa de nossas vidas.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

À UNICENTRO.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO.

Em especial:

Ao meu querido pai Cicero D. Bahia, que nos deixou há pouco tempo, mas fez tanto por mim ao longo da sua vida, sempre será minha maior força e inspiração na vida. Eu te amarei, eternamente.

## RESUMO

O consumo de chia tem crescido nos últimos anos devido à busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis. A chia apresenta uma composição diversificada, com destaque para presença de proteínas, as quais proporcionam todos os aminoácidos essenciais e essa semente não apresenta colesterol. É rica em vitamina B, em ômega-3 e em ômega-6 (ácidos graxos), antioxidantes, além de possuir macro e microelementos (Ca, Mg, P, Cu, Zn, Mn, Na e Fe). Considerando a contribuição nutricional decorrente da ingestão destes componentes para o organismo humano, o conhecimento e a análise de macro e microelementos presentes na chia torna-se importante para o consumidor deste tipo de alimento. A concentração e distribuição de metais na chia ainda é pouco conhecida, porém já existem estudos que fazem uso de ICP-MS, ICP-OES e um trabalho que fez uso da Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) para detecção de elementos nesse alimento. Porém, ainda são escassas as pesquisas reportadas na literatura voltadas a caracterização elementar desta oleaginosa, e a maioria dos estudos não apresentam procedimentos de validação os quais conferem maior confiabilidade as metodologias desenvolvidas. Em virtude disso, se torna necessária a realização de mais pesquisas sobre a composição elementar da chia. Neste sentido, um método simples e rápido para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de farinhas e sementes de chia, utilizando a extração assistida por ultrassom e a técnica de F AAS foi proposto. Primeiramente foi aplicado um planejamento de misturas do tipo simplex centroide para a otimização da composição dos solventes extratores, indicando como ótima uma mistura de 3,3 mL de ácido nítrico e 1,7 mL de peróxido de hidrogênio. Outras variáveis como massa de amostra, tempo de sonicação e tipo de filtração foram otimizadas de forma univariada. Na análise do tempo de sonicação foi observado que não haviam diferenças significativas nos teores dos metais extraídos da chia quando eram utilizados tempos maiores do que 30 minutos. Desta forma, foi definido como ótimo o tempo de 15 minutos de agitação ultrassônica. Na análise da influência da massa de amostra foi constatado que a utilização de 0,2 g de chia resulta em melhores taxas de extração para todos os metais. Para avaliar a influência do tipo de filtração foram comparados dois tipos de filtração simples, a com papel de filtro liso e a com papel de filtro pregueado. Dentre as duas formas de filtração, a com papel pregueado se mostrou mais eficiente, pois o tempo de filtração foi reduzido quando comparado ao tempo da filtração em papel liso. Desta forma, o método de extração assistida por ultrassom foi otimizado com composição de solventes extratores de 3,3 mL de ácido nítrico e 1,7 mL de peróxido de hidrogênio, sonicação por 15 minutos, 0,2 g de amostra e filtração com papel pregueado. Posteriormente foi realizado o estudo de validação em que foram analisadas as figuras de mérito linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O método de extração assistida por ultrassom mostrou-se simples, ambientalmente amigável, exato e preciso, apresentando limites de detecção de 0,5 a 4 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), boa linearidade com valores de  $R^2 > 99\%$  e valores de DPR de 4,9 a 8%, os quais foram menores do que os valores de DPR recomendados na literatura ( $< 11\%$ ). Para verificar a exatidão do método, os resultados de concentração dos metais obtidos através da extração assistida por ultrassom foram comparados aos dados da digestão por via seca das amostras de chia através da aplicação de um teste-*t* pareado no nível de 95% de confiança. Não se observaram diferenças significativas entre os métodos comparados para a análise de Cu, Fe e Mn indicando a boa exatidão da metodologia de extração desenvolvida para esses metais. Entretanto, uma diferença significativa entre os métodos comparados foi observada para Zn. Isso pode ser explicado por possíveis perdas de Zn na digestão por via seca devido a maior manipulação da amostra por parte do analista e o emprego de longos tempos de aquecimentos em altas temperaturas. O procedimento de extração proposto foi então aplicado em 10 amostras de farinhas e de sementes de chia de diferentes procedências, sendo que as concentrações médias foram  $20 \pm 1$ ,  $53 \pm 3$ ,  $57 \pm 3$  e  $57 \pm 3$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente. As concentrações dos metais determinados foram similares às encontradas em outros estudos para a mesma matriz. Com relação à ingestão diária recomendada de metais através do consumo diário de 25g de chia, a mesma apresenta uma contribuição de 505, 1320, 1412 e 1426  $\mu\text{g}$  de Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente.

**Palavras Chave:** Chia, metais, F AAS, extração assistida por ultrassom, planejamento de misturas, validação de método

## ABSTRACT

Recently, the consumption of chia has grown due to consumers' search for healthier foods. Chia has a diverse composition, with emphasis on the presence of proteins, which provide all the essential amino acids and this seed has no cholesterol. It is rich in vitamin B, in omega-3 and omega-6 (fatty acids), antioxidants, and has macro and microelements (Ca, Mg, P, Cu, Zn, Mn, Na and Fe). Considering the nutritional contribution resulting from the ingestion of these components to the human organism, knowledge and analysis of macro and microelements present in the chia becomes important for the consumer of this type of food. The concentration and distribution of metals in chia is still little known, but there are already studies that use ICP-MS, ICP-OES and a work that made use of Flame Atomic Absorption Spectrometry (F AAS) to detect elements in this food. However, there are still few studies reported in the literature regarding the elementary characterization of this oilseed and most studies do not present validation procedures, which give greater reliability to the developed methodologies. As a result, further research into the characterization of elemental composition of chia becomes necessary. In this sense, a simple and fast method for the determination of Cu, Fe, Mn and Zn in chia flour and seed samples using ultrasound assisted extraction and the F AAS technique was proposed. Firstly, a simplex centroid mixture design was applied to optimize the composition of the extracting solvents, indicating as optimal a mixture of 3.3 mL nitric acid and 1.7 mL of hydrogen peroxide. Other variables such as sample mass, sonication time and filtration type were optimized in univariate way. In the analysis of the sonication time it was observed that there were no significant differences on the extracted metal contents from the chia when times longer than 30 minutes were used. Thus, a time of 15 minutes of ultrasonic agitation was defined as optimal. In the analysis of the influence of the sample mass it was found that the use of 0.2 g chia results in better extraction rates for all metals. In order to evaluate the influence of the filtration type, a test was performed in which two simple filtration types were compared: filtration in plain filter paper and filtration in pleated filter paper. Among the two forms of filtration, the one with pleated paper was more efficient, because the filtration time was reduced when compared those one of the filtration on plain filter paper. Thus, the ultrasound assisted extraction method was optimized with composition of extracting solvents of 3.3 mL of nitric acid and 1.7 mL of hydrogen peroxide, sonication for 15 minutes, 0.2 g of sample and filtration in pleated paper. Subsequently, a validation study was performed in which merit figures of linearity, precision, accuracy, detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) were analyzed. The ultrasound assisted extraction method was simple, environmentally friendly, accurate and precise, with detection limits of 0.5 to 4 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), good linearity with values of  $R^2 > 99\%$  and RSD values of 4.9 to 8%, which were lower than the RSD values recommended in the literature ( $< 11\%$ ). To verify the accuracy of the method, the metal concentration results obtained by ultrasound assisted extraction were compared to data from dry digestion of the chia samples by applying a paired *t*-test at the 95% confidence level. No significant differences were observed between the compared methods for Cu, Fe and Mn analysis indicating the good accuracy of the developed extraction methodology for these metals. However, a significant difference between the compared methods was observed for Zn. This may be explained by possible losses of Zn in dry digestion due to greater manipulation of the sample by the analyst and to the use of long heating times at high temperatures. The proposed extraction procedure was then applied to 10 chia flour and seeds samples of different origins, and the average concentrations were  $20 \pm 1$ ,  $53 \pm 3$ ,  $57 \pm 3$  and  $57 \pm 3$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively. The determined concentrations of the metals were similar to those ones found in other studies for the same matrix. Regarding the recommended daily intake of metals through daily consumption of 25g of the chia, it presents a contribution of 505, 1320, 1412 and 1426  $\mu\text{g}$  of Cu, Fe, Mn and Zn, respectively.

**Keywords:** Chia, metals, F AAS, ultrasound assisted extraction, mixture design, validation method.

*Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante...  
O Pequeno Príncipe*

*A saudade acontece quando fica tudo de alguém que foi embora.  
Agatha Sthefanini*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM COLAPSO DAS BOLHAS DURANTES A EXTRAÇÃO.....	24
<b>FIGURA 2.</b> ILUSTRAÇÃO DOS PONTOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO S-C. ....	36
<b>FIGURA 3</b> FOTO DO TESTE REALIZADO COM O PAPEL ALUMÍNIO PARA VERIFICAR A EFETIVIDADE DA SONICAÇÃO DO BANHO DE ULTRASSOM. ....	41
<b>FIGURA 4.</b> GRÁFICOS DE VALORES DE RG EXPERIMENTAIS E VALORES DE RG AJUSTADOS PELO MODELO ESTATÍSTICO.....	46
<b>FIGURA 5.</b> GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTRÓIDE.....	47
<b>FIGURA 6.</b> GRÁFICO DE CONTOURNO DA SUPERFÍCIE GERADA PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROIDE CONSIDERANDO OS VALORES DE RG COMO RESPOSTA, EM QUE OS PONTOS DOS VÉRTICES SÃO REPRESENTADOS POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HNO <sub>3</sub> E H <sub>2</sub> O. ....	49
<b>FIGURA 7.</b> PERFIL DE OTIMIZAÇÃO BASEADO NOS VALORES DE DESEJABILIDADE PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTRÓIDE. ....	50
<b>FIGURA 8.</b> TAXAS DE EXTRAÇÃO MÉDIAS DE METAIS EM CHIA PARA O ESTUDO DO TEMPO DE SONICAÇÃO EM BANHO DE ULTRASSOM. ....	52
<b>FIGURA 9.</b> TAXAS MÉDIAS DE EXTRAÇÃO DE METAIS EM CHIA PARA O ESTUDO DE MASSA. ....	54
<b>FIGURA 10.</b> EXTRAÇÃO DE METAIS EM CHIA UTILIZANDO DIFERENTES CONDIÇÕES DE FILTRAÇÃO DA SOLUÇÃO RESULTANTE.....	56
<b>FIGURA 11.</b> CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO AQUOSO (PE-AQ) E DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO EXTRATOR (PE-ME) PARA A DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA POR F AAS. ....	63
<b>FIGURA 12.</b> CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO AQUOSO (PE-AQ) E ADIÇÃO DE PADRÃO (AP) PARA A DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA POR F AAS.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> INFORMAÇÕES DAS AMOSTRAS DE SEMENTES E DE FARINHAS DE CHIA AVALIADAS NO ESTUDO. ....	32
<b>TABELA 2.</b> PARÂMETROS OPERACIONAIS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM AMOSTRAS DE SEMENTES E DE FARINHAS DE CHIA POR F AAS. ....	34
<b>TABELA 3.</b> MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX-CENTRÓIDE. ....	37
<b>TABELA 4.</b> RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR PARA A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE METAIS EM SEMENTES E FARINHAS DE CHIA. ....	42
<b>TABELA 5.</b> ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS ESTATÍSTICOS GERADOS COM OS DADOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS. ....	43
<b>TABELA 6.</b> ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO. ....	45
<b>TABELA 7.</b> TAXAS DE EXTRAÇÃO E VALOR DE RG DOS ÍONS METÁLICOS AVALIADOS EM CHIA, EMPREGANDO A COMPOSIÇÃO DE SOLVENTE EXTRATOR PREVISTA DE 3,3 mL DE HNO <sub>3</sub> E 1,7 mL DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	51
<b>TABELA 8.</b> PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS EMPREGANDO AS CURVAS DE PADRÃO EXTERNO AQUOSO (PE-AQ) E DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO EXTRATOR (PE-ME). ....	62
<b>TABELA 9.</b> PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn POR F AAS EMPREGANDO AS CURVAS DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO AQUOSO (PE-AQ) E DE ADIÇÃO DE PADRÃO (AP). ....	63
<b>TABELA 10.</b> RESULTADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR DA CURVA ANALÍTICA PE-AQ, PARA O ESTUDO DA LINEARIDADE NA DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA POR F AAS. ....	65
<b>TABELA 11.</b> AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO PARA Cu, Fe, Mn e Zn. ....	66
<b>TABELA 12.</b> LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO PARA OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E DIGESTÃO POR VIA SECA. ....	67
<b>TABELA 13.</b> VALORES DE LD E LQ ENCONTRADOS NA LITERATURA, REFERENTES A DETERMINAÇÃO DE METAIS NA CHIA POR ICP-MS E ICP- OES. ....	68

<b>TABELA 14.</b> RESULTADOS DO ESTUDO DE PRECISÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO de Cu, Fe, Mn e Zn EM FARINHAS E SEMENTES DE CHIA POR FAAS. ....	69
<b>TABELA 15.</b> CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE Cu, Fe, Mn E Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) EM AMOSTRAS DE FARINHAS E SEMENTES DE CHIA OBTIDAS PELOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU) E PELA DIGESTÃO POR VIA SECA (VS) E DETERMINAÇÃO POR F AAS.....	70
<b>TABELA 16.</b> RESULTADOS DO ESTUDO DE EXATIDÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn E Zn EM FARINHAS E SEMENTES DE CHIA POR F AAS. ....	70
<b>TABELA 17.</b> CONCENTRAÇÕES DE Cu, Fe, Mn E Zn ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE FARINHAS E SEMENTES DE CHIA DE DIFERENTES LOCALIDADES DO BRASIL.....	71
<b>TABELA 18.</b> VALORES DE INGESTÃO DIÁRIA DE Cu, Fe, Mn E Zn, CONSIDERANDO UM CONSUMO DE 25 g DE CHIA, EM RELAÇÃO AOS VALORES DE IDR. ....	73

## LISTA DE SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AOAC</b>	Association of official Analytical Chemists
<b>F AAS</b>	Flame Atomic Absorption Spectroscopy
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonisation
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>CV</b>	Coeficiente de Variação
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinação
<b>R</b>	Coeficiente de Correlação
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b><i>F<sub>faj</sub></i></b>	Valores de <i>F</i> para falta de ajuste
<b><i>F<sub>obs</sub></i></b>	Valores de <i>F</i> observado
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>ICP-OES</b>	Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy
<b>ICP- MS</b>	Inductively coupled plasma mass spectrometry
<b>D</b>	Desejabilidade Global
<b>D<sub>i</sub></b>	Desejabilidades Individuais
<b>RG</b>	Resposta Global
<b>PI</b>	Precisão Intermediária
<b>IDR</b>	Ingestão Diária Recomendada

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE SIGLAS.....	vii
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Objetivo Geral .....	15
1.2.2 Específicos.....	15
<b>CAPÍTULO 2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 ORIGEM DA CHIA .....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Composição Química e Nutricional da Chia .....	16
<b>2.2 METAIS E SUA IMPORTÂNCIA NO ORGANISMO .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Cobre (Cu).....	17
2.2.2 Ferro (Fe).....	18
2.2.3 Manganês (Mn) .....	18
2.2.4 Zinco (Zn).....	19
<b>2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ALIMENTOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA .....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Digestão Assistida por Micro-Ondas.....	21
2.4.2 Digestão por Via Seca .....	22
2.4.3 Digestão por Via Úmida.....	22
2.4.4 Extração Assistida por Ultrassom.....	22
<b>2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>26</b>

2.5.1	Seletividade, Curva Analítica e Linearidade .....	26
2.5.2	Limite e Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	27
2.5.3	Precisão.....	28
2.5.4	Exatidão.....	29
<b>CAPÍTULO 3 – OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM...</b>		<b>30</b>
<b>3.1. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....</b>		<b>31</b>
<b>3.2. METODOLOGIA .....</b>		<b>32</b>
3.2.1.	3.2.1.1. Materiais e Métodos.....	32
	3.2.1.1.1. Amostragem .....	32
	3.2.1.1.2. Reagentes.....	33
	3.2.1.1.3. Limpeza dos Materiais .....	33
	3.2.1.1.4. Equipamentos e Parâmetros Instrumentais.....	33
<b>3.3. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA O PREPARO DE AMOSTRA.....</b>		<b>34</b>
	3.3.1. Digestão por Via Seca .....	34
	3.3.2. Extração Assistida por Ultrassom .....	34
<b>3.4. ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM</b>		<b>35</b>
	3.4.1. Otimização da Composição do Solvente Extrator por Planejamento de Misturas Simplex-Centróide .....	35
	3.4.2. Estudo de Otimização Univariado.....	39
<b>3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>		<b>40</b>
3.5.1.	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE Extração Assistida por Ultrassom.....	40
<b>CAPITULO 4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA A DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA POR F AAS.....</b>		<b>58</b>
<b>4.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....</b>		<b>59</b>
<b>4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>		<b>59</b>
	4.2.1. Curvas Analíticas e Linearidade.....	59
	4.2.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	60
	4.2.3. Precisão .....	60
	4.2.4. Exatidão.....	61
<b>4.3. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE CHIA.....</b>		<b>61</b>

4.4.1. Curvas Analíticas e Linearidade.....	62
4.4.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	66
4.4.3. Precisão .....	68
4.4.4. Exatidão.....	69
<b>4.5. APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM NA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM CHIA POR F AAS .....</b>	<b>71</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

### 1.1 INTRODUÇÃO

A semente de chia é considerada uma fonte de nutrientes para as indústrias alimentares sendo conhecida como um alimento funcional. Em relação a classe de alimentos funcionais, os mesmos são conhecidos por produzirem efeitos fisiológicos ou metabólicos no organismo, através de algum nutriente presente em sua composição que auxilie, beneficemente, uma ou mais funções no organismo (MORAES e COLLA, 2006; COELHO e MELLADO, 2012). Geralmente, são alimentos enriquecidos com fibras, óleos essenciais, vitaminas, minerais e antioxidantes (VIDAL, et al., 2012; SOUZA, et al., 2003; ROBERFROID, 2002; COELHO e MELLADO, 2012; GARCÍA-SALCEDO et al., 2018).

A produção mundial da semente de chia está aumentando devido às suas propriedades, as quais vêm sendo consideradas benéficas à saúde, tornando-a dessa forma, mais popular. As sementes de chia são utilizadas como suplementos nutricionais, na fabricação de barras de cereais matinais, biscoitos, pães, entre outros. Além disso, elas podem ser consideradas uma fonte completa de proteínas, sendo também ricas em vitamina B, ácidos graxos (ômega 3 e 6) e antioxidantes (miricetina, quercetina, kaempferol e ácido cafeico). Outros aspectos interessantes de sua composição química são a ausência de colesterol, mínima oxidação dos lipídeos, e baixo teor de sódio, o que torna a chia atrativa para a indústria alimentícia (MUÑOZ et al., 2013; TOSCO, 2004).

O organismo dos seres humanos, para funcionar de forma correta, necessita de uma série de elementos essenciais, conhecidos por desempenhar um papel fundamental na manutenção da saúde humana. Entretanto, como o corpo humano não é capaz de produzi-los, os mesmos podem ser obtidos por meio de alimentos de origem animal e vegetal, que são utilizados como a principal fonte de minerais na alimentação (GUPTA et al., 2014).

Com relação a chia, estudos que contemplem a composição elementar e o emprego de métodos analíticos rápidos e eficientes para tal finalidade, ainda são escassos.

Existe uma grande variedade de técnicas analíticas para a determinação de metais em alimentos. A espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (F AAS), vêm sendo aplicada na análise elementar de diversas matrizes. A técnica apresenta vantagens na determinação de metais, dentre as quais, destacam-



se a simplicidade, robustez, seletividade e custo relativamente baixo (BRANDÃO, 2010; NASCENTES et al., 2004). No entanto, é necessário que a amostra esteja no estado líquido, para facilitar sua injeção no equipamento. Desta forma, a mesma necessita passar por um preparo prévio antes de ser introduzida no equipamento. Para isso, alguns métodos são muito empregados no tratamento de diversos tipos de amostras. Esses métodos para a mineralização de material orgânico em alimentos também conhecidos como tradicionais, basicamente se baseiam na digestão por via úmida (em sistema aberto ou assistida por micro-ondas) e na digestão por via seca (calcinação) (SOUSA et al., 2015). Porém, esses métodos apresentam desvantagens como alto custo, perda de elementos voláteis e contaminação da amostra (SANTOS et al., 2016). De modo a tentar minimizar estes inconvenientes, vêm sendo propostos novos procedimentos para o tratamento de amostras, como o uso da extração assistida por ultrassom, a qual tem o objetivo de aumentar a eficiência de extração e contribuir com o meio ambiente, reduzindo o uso de reagentes e a geração de resíduos (FERREIRA et al., 2014; BENDICHO e LAVILLA, 2013; VÉLEZ-ERAZO et al., 2018; FALCO et al., 2018).

Até o momento, foram encontrados poucos estudos na literatura, que descrevem a análise de metais em sementes de chia e outros grãos, e estes têm utilizado preferencialmente a digestão assistida por micro-ondas como técnica de preparo de amostra e a quantificação pela técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES e ICP-MS) (BOLAÑOS, MARCHEVSKY E CAMIÑADE, 2015; MENDIVELSO, 2016; DING et al., 2018; RUBIO et al., 2018). Mendivelso (2016), entre os estudos reportados, é a única autora que descreve a utilização da extração assistida por ultrassom como preparo de amostra para a determinação de Mg, Zn, Mn, Cu, Ca e Fe em sementes e farinhas de chia empregando F AAS. Neste estudo, para a extração assistida por ultrassom foi utilizada uma solução diluída de HNO<sub>3</sub> (15%, v/v) a qual permitiu a extração eficiente somente de Mg, Zn e Mn.

Assim, torna-se importante o desenvolvimento e a validação de novas metodologias analíticas rápidas, precisas e ambientalmente amigáveis, como a extração assistida por ultrassom, para a determinação de metais essenciais, tais como Cu, Fe, Mn e Zn, em sementes e farinhas de chia, como forma de agregar valor comercial ao produto e garantir a segurança alimentar dos consumidores.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver, validar e aplicar um método de extração assistida por ultrassom para a determinação de Fe, Mn, Cu e Zn em sementes e farinhas de chia empregando a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS).

### **1.2.2 ESPECÍFICOS**

- Desenvolver um método de extração assistida por ultrassom para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em sementes e farinhas de chia aplicando-se planejamento de misturas e estudos univariados.
- Validar a metodologia de extração assistida por ultrassom desenvolvida, avaliando parâmetros de validação como limites de detecção e de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.
- Determinar a concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de sementes e de farinhas de chia de diferentes procedências utilizando a metodologia de extração validada e empregando a técnica de F AAS.
- Avaliar a ingestão diária recomendada (IDR) dos metais Cu, Fe, Mn e Zn presentes na chia utilizando como referência a legislação brasileira.

## CAPÍTULO 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ORIGEM DA CHIA

A *Salvia hispanica L.* é popularmente conhecida como chia, e suas sementes tem de (1 a 2 mm) sendo de coloração preta acinzentada, com manchas irregulares em sua maioria avermelhadas e em alguns casos brancas (MIGLIAVACCA et al., 2014). Estas sementes são originárias da região centro-oeste do México até o norte da Guatemala e atualmente, vêm sendo cultivadas em países como Austrália, Bolívia, Colômbia, Guatemala, México, Peru e Argentina. No Brasil, as regiões do oeste Paranaense e noroeste do Rio Grande do Sul começaram a investir no cultivo de chia nas safras 2014/15 (AYERZA et al., 2004; MIGLIAVACCA et al., 2014).

A chia possui elevado valor nutricional por isso tem sido muito utilizada pela indústria alimentícia, por apresentar componentes importantes e benéficos a saúde tais como os ácidos  $\alpha$ -linolênico (ômega-3) e linolêico (ômega-6), antioxidantes, fibras dietéticas e proteínas (PEIRETTI e GAI, 2009; COELHO e MELLADO, 2012).

#### 2.1.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DA CHIA

Segundo Tosco (2004) a chia é uma fonte completa de proteínas proporcionando todos os aminoácidos essenciais para a ingestão humana, além de não possuir colesterol em sua composição, ser rica em vitamina B e ser uma fonte natural de ácidos graxos (ômega-3 e ômega-6) e antioxidantes que atuam como potenciais redutores das doenças cardiovasculares. A presença dos antioxidantes (miricetina, quercetina, kaempfenol e ácido cafeico) faz com que sua oxidação seja mínima, tornando-a assim, atrativa para a indústria alimentícia (TOSCO, 2004). A diferença entre a chia e as outras fontes de ômega-3 é o seu baixo teor de sódio, o que a torna um excelente alimento para as pessoas que sofrem de hipertensão e necessitam de uma dieta com baixos níveis deste elemento (BUSILACCHI et al., 2013).

Em relação à composição química, as sementes de chia são compostas por proteínas (15 – 25%), lipídeos (30 – 33%), fibras altamente dietéticas (18 – 30%), carboidratos (26 - 41%), cinzas (4 – 5%), minerais, vitaminas e matéria seca (90 – 93%) (MIGLIAVACCA et al., 2014).

A chia é rica em ácidos graxos poli-insaturados particularmente o ômega-3, os quais ajudam a prevenir ou tratar doenças cardíacas, câncer, depressão e mal de Alzheimer

(MORAES e COLLA, 2006; COELHO e MELLADO, 2014). Sua quantidade alta de fibras (aproximadamente 34,6%) aumenta a saciedade e diminui o consumo de energia e isso torna a utilização da semente interessante para formulações da indústria alimentícia (OLIVOS-LUGO et al., 2010; AYERZA et al., 2004; COELHO e SALAS-MELLADO, 2015).

Desta forma, a chia pode contribuir para o controle de algumas doenças e como a mesma não possui glúten, também pode ser consumida por pessoas celíacas (COELHO e SALAS-MELLADO, 2015).

## **2.2 METAIS E SUA IMPORTÂNCIA NO ORGANISMO**

Os metais são elementos inorgânicos que se combinam geralmente a outros grupos de elementos químicos. Vários nutrientes minerais são conhecidos por desempenharem papéis fundamentais na manutenção da saúde humana (MORAES e COLLA 2006). No organismo, estes se encontram quelados, isto é, combinados com constituintes orgânicos que podem ser enzimas, hormônios, proteínas e aminoácidos. Como o organismo humano não é capaz de produzir esses elementos essenciais para a saúde, os mesmos podem ser obtidos através de alimentos de origem animal e vegetal. (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et al., 2014; JESUS, 2015; VIZZOTTO et al., 2017).

Os metais são classificados em macronutrientes e micronutrientes, em que a ingestão diária dos macronutrientes recomendada é  $> 100$  mg/dia, e a ingestão diária de micronutrientes recomendada é  $< 100$  mg/dia. Os macronutrientes incluem Ca, Na, K, P, S e Mg. Os micronutrientes são chamados frequentemente de “oligoelementos” e incluem Fe, Zn, Cu, Mn, entre outros (AREAL, 1988; TORRES et al., 2000; VIZZOTTO et al., 2017).

### **2.2.1 COBRE (Cu)**

O cobre é um micronutriente essencial com potencial antioxidante, além de ser um componente de diversas enzimas envolvidas na produção de energia celular. Participa também na produção de tecidos conectivos e na produção de melanina (MACÊDO et al., 2010). A atividade de enzimas, como a catalase e a tirosina, dependem da presença do cobre, sendo esse mineral um importante cofator de enzimas antioxidantes (VIZZOTTO et al., 2017). Outros sintomas relacionados com a baixa ingestão de cobre, são a deficiência no crescimento e a maior propensão do organismo a infecções. Já a ingestão excessiva do metal é tóxica para o organismo

e pode causar hemorragia gastrointestinal, náuseas e vômitos (MACÊDO et al., 2010). Na literatura tem sido observado que os teores de Cu em chia podem variar no intervalo de 3,65 até 22,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  (BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018). Alimentos ricos em cobre são carnes, frutos do mar, sementes e oleaginosas, e a quantidade de Cu recomendada por dia é de 900  $\mu\text{g}$  (FRAGA, 2005; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; AMANCIO, 2017; BRASIL, 2005).

### 2.2.2 FERRO (Fe)

O ferro é indispensável para o correto funcionamento de muitas funções fisiológicas. É um constituinte da molécula da hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  no sangue e com outros grupos proteicos forma a molécula de mioglobina que estoca oxigênio nos músculos, e os citocromas que são enzimas que asseguram a respiração celular. Seu excesso pode levar a convulsões, náuseas, vômitos e hipotensão arterial (JESUS, 2015). Estudos relatam que a chia, apresenta teores de Fe entre 44,6 até 243,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018). Alimentos ricos em ferro são espinafre, aspargo, batatas, cenouras e cerejas, carnes vermelhas e folhas escuras e a quantidade recomendada deste elemento a ser ingerida por dia é de 14000  $\mu\text{g}$  (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et al., 2014; BRASIL, 2005).

### 2.2.3 MANGANÊS (Mn)

O manganês é um elemento químico com potencial antioxidante, responsável pela ativação de enzimas que participam do metabolismo com os carboidratos, aminoácidos e colesterolis, e está presente na formação de ossos, cartilagens e cicatrização de feridas. Seus benefícios para a manutenção do organismo são inúmeros, sendo que o mesmo pode atuar como protetor de células hepáticas, na biossíntese de proteínas e no metabolismo dos neurotransmissores. Sua deficiência no organismo humano pode causar anormalidades no esqueleto, interferir no crescimento e causar disfunção reprodutiva (WHITNEY e ROLFES, 2008; BOWMAN et al., 2011). Teores médios de Mn em chia, relatados na literatura, encontram-se no intervalo de 26,1 até 140  $\mu\text{g g}^{-1}$  (BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018). Alimentos considerados como

fontes de manganês são cereais integrais, nozes e leguminosas. Recomenda-se o consumo de até 2300 µg de Mn por dia (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et. al., 2014, BRASIL, 2005).

#### **2.2.4 ZINCO (Zn)**

Aproximadamente cem enzimas dependem do zinco para realizar suas reações químicas vitais no organismo. O metal atua no crescimento, no sistema imune, nas funções neurológicas, atuando na estrutura das proteínas, membranas celulares, na síntese de hormônios e é essencial na cicatrização de feridas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et. al., 2014).

Nosso organismo absorve entre 5 e 10 % do zinco consumido em nossa dieta, pois algumas substâncias, a exemplo dos fítatos que são sais do ácido fítico, podem formar complexos insolúveis com o Zn, reduzindo a sua biodisponibilidade (BENEVIDES et al., 2015). A deficiência de zinco pode causar atraso de maturidade sexual, déficit de crescimento, pouco apetite, deficiência do sistema auto-imune, entre outros problemas (MACÊDO et al., 2010). De acordo com trabalhos reportados na literatura (BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018), os teores médios de Zn na chia encontram-se no intervalo de 32,6 até 75 µg g<sup>-1</sup>. Alimentos que se apresentam como boas fontes de zinco são carnes, leites e derivados. A recomendação é que se pode ingerir até 7000 µg deste elemento por dia (BRASIL, 2005; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et. al., 2014).

Levando em consideração que o organismo não é capaz de produzir naturalmente esses elementos, os mesmos devem ser ingeridos através dos alimentos, pois esses são as principais fontes dos mesmos e que se tornam essenciais para se manter o organismo em equilíbrio (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et al., 2014).

### **2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ALIMENTOS**

Atualmente, existe uma grande variedade de técnicas analíticas para a análise de metais em alimentos. As técnicas mais frequentemente utilizadas são a espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry* - F AAS) (MACHADO

et al., 2016), a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (do inglês *Graphite furnace atomic absorption spectroscopy* - GF AAS) (ALEIXO et al., 2000), a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* - ICP-OES) (MORGANO et al., 1999), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry* - ICP-MS) (SAIDELLES et al., 2013; KASTENMAYER, 2007) e a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) (MORAES et al., 2009). O método analítico a ser escolhido varia de acordo com as necessidades de detecção e de quantificação do analito.

A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) é a técnica mais utilizada para análises elementares de macro e micronutrientes em níveis de  $\text{mg L}^{-1}$ . A mesma pode ser utilizada para a quantificação de elementos na faixa de ppm (partes por milhão), com características de simplicidade, seletividade, alta velocidade analítica e baixo custo (SANTOS, 2016). A técnica é baseada na absorção do átomo no estado livre, onde cada elemento absorve radiação em comprimentos específicos de onda, o que torna a técnica seletiva (FERREIRA et al., 2018).

O equipamento de absorção atômica é composto por um atomizador de chama que contém um nebulizador, o qual converte a solução da amostra que já se encontra em estado líquido para uma névoa ou aerossol, que é introduzido em um queimador (SKOOG et al., 2013). Na zona de combustão ocorre a dessolvatação dos átomos. As partículas são convertidas em átomos gasosos. Após, os átomos são carregados para a parte da chama, onde acontece a medida (SKOOG et al., 2013).

Na literatura, têm sido reportados vários trabalhos empregando a técnica de F AAS para a determinação de metais em alimentos. Vasconcelos et al. (2017) realizaram a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em raízes de mandioca. Ferreira et al. (2014) aplicaram a extração assistida por ultrassom para a determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó. Garrido et al. (2013) também propuseram a determinação de metais pesados em cenouras e espinafre cultivados em organoponia urbana. DYNER et al. (2016) realizaram um estudo sobre a determinação de Ca, fibra alimentar e fitatos em diversas farinhas de cereais, pseudocereais e outros, onde os autores fizeram uso da técnica de F AAS para a quantificação de metais em algumas oleaginosas.

A técnica de F AAS é muito utilizada para vários tipos de matrizes, e mostra uma boa resposta para a quantificação de metais em níveis de ppm; isso faz com que se torne uma técnica

muito atrativa para as indústrias pois a mesma é rápida e de baixo custo quando comparada com as demais técnicas analíticas aplicadas a análise elementar, sendo a mais empregada em análises de rotina em laboratórios de pesquisa, de controle de qualidade ou de fiscalização

## **2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA**

A técnica de F AAS aplicada na análise elementar, exige a adoção de um preparo prévio da amostra, caso a mesma não se encontre na fase líquida. Os métodos de preparo de amostra utilizados para determinação de metais em alimentos podem ser a principal fonte de erros nas análises. Isso porque eles podem sofrer inúmeras interferências por meio da volatilização do analito, pela contaminação por reagentes e vidrarias ou devido a dissolução incompleta da matriz (BRANDÃO, 2010; BULDINI et al., 2002; HOENIG e KERSABIEC, 1996; GALVÃO, 2016). Os métodos mais utilizados são a digestão por via seca (calcinação), a digestão por via úmida ou a digestão assistida por micro-ondas (KRUG, 2006; TREJOS, 2012; POHL, 2009; KASTENMAYER, 2007; MENDIVELSO, 2016; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018)).

### **2.4.1 DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS**

A digestão assistida por forno de micro-ondas foi proposta como uma estratégia de decomposição de amostra na década de 70, e atualmente está sendo amplamente utilizada como ferramenta no preparo de amostras (OLIVEIRA, 2003). A mesma faz uso de frascos resistentes que são expostos a altas pressões e ácidos concentrados, fazendo com que a decomposição das amostras seja rápida e eficiente (VIEIRA *et al.*, 2005). A digestão assistida por micro-ondas é utilizada para todos os tipos de amostras, pois permite a decomposição total de toda matéria; a vantagem de ser um sistema fechado é que pode haver menor contaminação da solução digerida.

Porém, a mesma apresenta desvantagens como o uso de elevadas temperaturas e pressões, gerando risco para o analista. Além disso, o equipamento tem custo elevado e assim se torna pouco atraente para análises de rotina, bem como exige para cada matriz a otimização do programa de aquecimento para o forno de micro-ondas (NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; KRUG, 2006; FREITAS *et al.*, 2014; MENDIVELSO, 2016).



#### **2.4.2 DIGESTÃO POR VIA SECA**

A digestão por via seca consiste na decomposição da amostra por combustão, e é amplamente utilizada para a determinação de metais em amostras orgânicas. Faz uso de elevadas temperaturas (400 a 800 °C) para que ocorra a oxidação da matéria orgânica, resultando assim, em um resíduo inorgânico que posteriormente é diluído em ácidos (PERONICO, 2014, 2016; SKOOG *et al.*, 2005; KORN *et al.*, 2008). De modo geral, a calcinação consiste em colocar uma quantidade de amostra em um cadinho (usualmente porcelana), e aquecer em chapa de aquecimento ou bico de Bunsen, até que o material comece a carbonizar. Para terminar a carbonização do material, o mesmo é levado a um forno tipo mufla, em temperaturas entre 450 e 550 °C, onde permanece pelo tempo que seja necessário, para que o material orgânico seja totalmente incinerado, sendo assim obtido um resíduo inorgânico não volátil (KRUG, 2006).

Durante todo o procedimento deve-se tomar cuidado com temperaturas elevadas para que não aconteçam perdas por volatilização das espécies inorgânicas com baixo ponto de ebulição, e fornecer temperatura suficiente para que seja possível a decomposição por completo da amostra (KRUG, 2006).

#### **2.4.3 DIGESTÃO POR VIA ÚMIDA**

A digestão ocorre com o auxílio do aquecimento da matriz na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, geralmente ácido nítrico, ácido sulfúrico ou ainda ácido perclórico. Podem ser utilizados combinados ou individualmente e podem ainda ser associados ao peróxido de hidrogênio. Este método de preparo de amostra é eficiente para determinar elementos em baixas concentrações na matriz. Se os ácidos utilizados forem suficientemente oxidantes e o aquecimento for realizado em altas temperaturas é possível oxidar completamente a matriz com esse método de digestão (NOGUEIRA *et al.*, 2005; KRUG, 2010).

#### **2.4.4 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Os métodos convencionais de preparo de amostras têm desvantagens tais como alto custo, perda de elementos voláteis e contaminação da amostra. Por isso, novos procedimentos

vêm sendo propostos para o tratamento de amostras, como o uso da extração assistida por ultrassom, com o objetivo de aumentar a eficiência de extração e contribuir com o meio ambiente reduzindo o consumo de reagentes e o volume de geração de resíduos, o consumo de energia e o risco ocupacional (FERREIRA et al., 2014; SILVA, 2012; LENARDÃO, 2003; PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2007).

A extração assistida por ultrassom se mostra como uma alternativa de baixo custo e com alta eficiência quando comparada a outras técnicas de extração tradicionais que utilizam matérias-primas de custo elevado (GARCIA-SALAS et al., 2010). Esta técnica é utilizada para a extração de metais e outros compostos em amostras diversas, principalmente alimentos (FERREIRA et al., 2014) apresentando alta reprodutibilidade e rapidez no processo de extração da amostra em relação as técnicas convencionais.

O processo de extração baseia-se na ação das ondas mecânicas de baixa frequência (< 1 MHz), as quais são responsáveis pela formação e o colapso de microbolhas de cavitação ocasionando áreas pontuais de alta pressão e temperatura na solução (LUZ, 1998). Este fenômeno facilita o processo de extração dos elementos, ocasionando a destruição da matéria orgânica e deixando os mesmos mais disponíveis na solução extratora, ocorrendo a sedimentação do material particulado em suspensão e promovendo a quebra de células vegetais. Esta é uma técnica simples e eficiente para extração de metais em amostras de alimentos, pois a mesma não faz uso de altas temperaturas nem de longos tempos de preparo de amostra (CAVALHEIRO, 2013; CARRERA et al., 2012; FERREIRA et al., 2018; FREITAS, 2015; LUZ, 1998; NEVES et al., 2009).

A extração assistida por ultrassom pode ser afetada por várias variáveis, como amplitude e frequência do ultrassom, composição do solvente extrator, temperatura, pH do solvente e relação solvente-sólido, tempo de sonicação, massa da amostra, e em virtude disso, é necessário otimizar esses parâmetros de acordo com as condições da matriz de interesse. É uma técnica considerada de baixo custo, utiliza pouca quantidade de reagentes sendo considerada a melhor técnica de preparação de amostras quando comparada com os métodos citados anteriormente (CARRERA et al., 2012; FERREIRA et al., 2014; FREITAS, 2015; LUZ, 1998; NEVES et al., 2009).

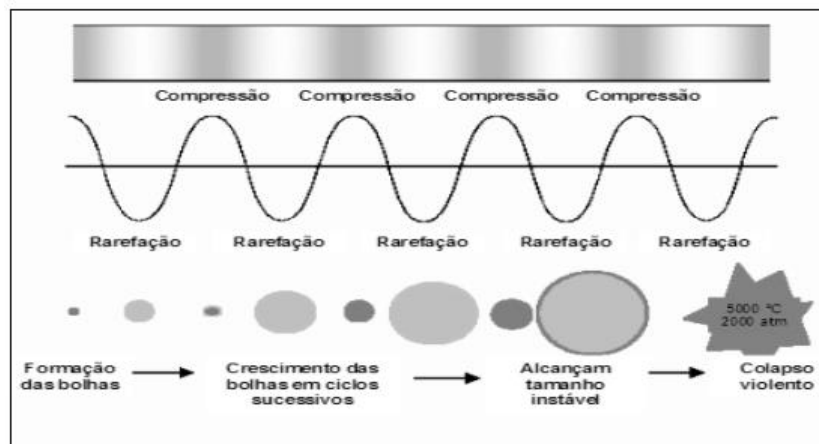
Durante a extração há produção de cavitação, ou seja, a formação de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultando em um forte estresse (CHEMAT et al., 2011). Essa é uma das particularidades do ultrassom, pois assim o mesmo facilita a interação do solvente com a matriz, aumentando o contato da amostra com o líquido extrator e otimizando

os processos de difusão e de transferência de massa, aumentando assim a eficiência da extração ou reduzindo o tempo de extração (VINATORU, 2001).

As ondas ultrassônicas, durante a extração, agem na matriz a fim de alterar suas propriedades físicas e químicas. O efeito cavitacional que o ultrassom proporciona facilita a quebra das moléculas da matriz e assim faz com que aconteça a liberação de compostos de interesse (CHEMAT et al., 2011; VINATORU, 2001; SHIRSATH et al., 2012).

O líquido é exposto a ondas ultrassônicas onde são geradas bolhas de gás que são formadas devido a passagem de uma onda acústica de alta potência no meio líquido estudado. Essas bolhas aumentam e diminuem durante as fases de rarefação e de compressão da onda acústica que se propaga através do meio líquido até que haja implosão das mesmas. O processo pode ser observado na Figura 1.

**Figura 1:** EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM COLAPSO DAS BOLHAS DURANTES A EXTRAÇÃO.



(FONTE: GEDANKEN, 2014)

Algumas variáveis podem interferir na efetividade da cavitação como a intensidade do ultrassom, a viscosidade da solução, a temperatura, a pressão do meio extrator, a frequência e também da amplitude do equipamento utilizado. Durante a rarefação e a implosão das bolhas também acontecem processos físicos levando ao rompimento das moléculas da matriz estudada; isso faz com que matriz apresente maior superfície de contato com o solvente extrator e dessa forma seja possível se ter mais disponível em solução do analito a ser extraído. No decorrer do processo de cavitação são também formados radicais livres ( $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{O}_2\text{H}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etc) no meio líquido, e estes por sua vez tem a capacidade de oxidar compostos orgânicos presentes no meio

extrator e na matriz analisada (KRUG, 2010, BENDICHO et al., 2012, FERREIRA, 2016., LEITE, 2015).

Esta técnica também tem sido amplamente estudada pela indústria de alimentos, em processos de emulsificação, homogeneização, esterilização, filtração, secagem, separação e extração de compostos sendo considerada uma tecnologia limpa de baixo custo (TAO & SUN, 2015).

Muitos trabalhos já reportam a utilização da extração assistida por ultrassom no preparo de amostras para a análise elementar de matrizes alimentícias, de amostras ambientais, entre outras (FERREIRA et al., 2014; NASCENTES et al., 2001; BERNARDO; ASCHERI; CARVALHO, 2016).

Um trabalho que reporta a extração assistida por ultrassom como método de preparo de amostra em oleaginosas é o descrito por PERONICO *et al.* (2016); utilizando a técnica de F AAS para a quantificação de Ca, Cu, Mn e Mg. A condição proposta para o preparo de amostra foi a utilização de 0,3 g de amostra, 10 mL de HNO<sub>3</sub> 1,40 mol L<sup>-1</sup>, e 10 minutos de sonicação em banho de ultrassom a temperatura de 25 °C.

Mendivelso (2016) reportou o emprego da extração assistida por ultrassom para a análise de metais em chia utilizando 0,5 g de amostra, 25 mL de HNO<sub>3</sub> (5%, v/v), e sonicação em banho de ultrassom por 30 minutos. Este procedimento se mostrou adequado para a determinação de Mg, Mn e Zn, porém para Fe, Cu e Ca verificou-se a necessidade de estudos mais aprofundados para melhorar a extração destes elementos na amostra de chia (MENDIVELSO, 2016).

Considerando-se as diferenças de composição química e física da chia, faz-se necessário um estudo aprofundado das condições de extração para esta matriz, uma vez que a distribuição e a concentração dos metais nesta oleaginosa ainda são pouco conhecidas. Assim surge a importância de se realizar estudos que permitam determinar as condições ótimas para a extração de Mn, Zn, Cu e Fe onde cada um destes elementos apresenta suas particularidades em termos de sua ligação com a matriz.

Para verificar a confiabilidade dos estudos realizados e as condições ótimas deve ser realizado um estudo de validação das metodologias desenvolvidas (ANVISA, 2017).

## 2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para as indústrias, o controle de qualidade é de extrema importância, pois a partir dele pode-se garantir que o produto atende as especificações e expectativas dos consumidores. Precisa-se ter o controle da qualidade nos resultados de análises de medicamentos, alimentos, contaminantes, e os mesmos são feitos através da validação de métodos analíticos (BARBOZA et al., 2010). Na indústria alimentícia, a validação de métodos está principalmente associada com a segurança alimentar e a garantia de espaço para o produto no mercado (SOUZA, 2007).

O desenvolvimento de novos métodos analíticos deve garantir a confiabilidade dos resultados da amostra e este deve ser submetido à avaliação denominada validação.

No Brasil, existem duas agências reguladoras, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Parâmetros analíticos que fazem parte da validação de métodos e também são conhecidos como figuras analíticas de mérito são seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2018, BRASIL, 2017; NATA 2018).

### 2.5.1 SELETIVIDADE, CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

A seletividade é a capacidade do método de separar o analito de outros interferentes presentes na amostra. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

A curva analítica é a relação matemática entre o sinal medido e a concentração do analito. A mesma deve conter no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva (RIBANI et al., 2004; FERREIRA, 2016; GALVÃO, 2016; ANVISA, 2017).

A padronização por adição de padrão consiste na adição de quantidades conhecidas do analito na amostra para a construção da curva analítica, o que pode eliminar possíveis efeitos da matriz (CASSIANO et al., 2009). A padronização externa em meio aquoso pode ser realizada quando as soluções aquosas, contendo concentrações conhecidas dos metais, são preparadas a partir de uma solução padrão (CASSIANO et al., 2009). A padronização por simulação do meio extrator também pode ser utilizada na construção de curvas analíticas, sendo que neste caso as soluções padrões são preparadas com o meio utilizado nas extrações dos metais nas amostras, utilizando as mesmas quantidades de reagentes extratores, e o mesmo procedimento de extração

das amostras. A padronização interna consiste na preparação dos padrões contendo diferentes concentrações do analito, onde é adicionada uma quantidade fixa do padrão interno (RIBANI et al., 2004; FERREIRA, 2016; CASSIANO et al., 2009).

A padronização externa é o método mais vantajoso para construção das curvas analíticas, devido a sua rapidez, facilidade e menor consumo de reagentes. Porém, a mesma é sensível a erros de preparo de amostras e só deve ser utilizada quando é comprovado que não existe interferência de matriz (ANDRADE et al., 2014; RIBANI et al., 2004).

A linearidade do método deve ser avaliada aplicando-se uma regressão linear aos dados para a curva de calibração. Deve ser avaliado seu coeficiente de correlação ( $r$ ) que é o parâmetro utilizado para estabelecer se o modelo apresenta uma associação linear entre o sinal analítico e a concentração dos padrões; quanto mais próximo a 1,0 menor é a dispersão dos pontos experimentais. Porém, o coeficiente de correlação não é suficiente para estabelecer se uma curva analítica apresenta linearidade. Desta forma, a linearidade deve ser avaliada pela análise de regressão linear e dos gráficos de resíduos (INMETRO 2018; ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004). Se  $F_{reg} \geq F_{crítico}$ , a regressão é significativa. Se  $F_{reg} \leq F_{crítico}$ , não há indicação da relação de linearidade para a curva analítica investigada. Quanto maior for o valor de  $F_{reg}$ , mais significativa será a relação linear entre o sinal analítico e a concentração (CASSIANO et al., 2009).

### 2.5.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito, em uma amostra, que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis (FREITAS et al., 2015; RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2017).

Os limites (LD e LQ) podem ser calculados utilizando-se parâmetros da curva analítica como descrito nas equações 1 e 2.

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

$$LQ = \frac{10 SB}{b} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

SB= desvio padrão das medidas do branco analítico.

b= inclinação da curva de calibração.

### 2.5.3 PRECISÃO

Como descrito por Ribani et al. (2004), a precisão demonstra a dispersão de resultados entre ensaios repetidos de uma mesma amostra. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto, sendo, geralmente, estimada pelos desvios padrões relativos (DPR) ou pelo coeficiente de variação (CV). A precisão pode ser expressa de acordo com a equação 3.

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

em que DPR= desvios padrão relativos;

s = desvio padrão;

$\bar{x}$  = valor médio do número total de medidas.

A precisão pode ser avaliada por estimativas de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade é a habilidade do método em repetir em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições. A precisão intermediária mede a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são realizadas em dias, em equipamentos e por analistas diferentes e a reprodutibilidade estima a capacidade do método de reproduzir resultados em diferentes laboratórios. Quando não é possível avaliar a precisão com amostras reais ou certificadas, podem ser utilizadas amostras preparadas artificialmente ou amostras adicionadas de padrão (FERREIRA et al., 20014; RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

A precisão intermediária e a reprodutibilidade também podem ser expressas em termos do valor de Horrat, utilizado principalmente na área de alimentos (AOAC, 2012; GONZALEZ

et al., 2007). Para o cálculo desse parâmetro é utilizado o desvio padrão relativo calculado a partir da ANOVA dos dados para as amostras avaliadas utilizando a equação 4.

$$Horrat = \frac{DPR_{laboratório}}{DPR_{horwitz}} \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

$DPR_{laboratório}$  = desvio padrão relativo relacionado a precisão intermediária obtido pela ANOVA ( $DPR_{PI}$  ou  $DPR_R$ );

$DPR_{HORWITZ}$  = desvio padrão relativo previsto, calculado pela fórmula de Horwitz, de acordo com a equação 5.

$$DPR_{HORWITZ} = 2C^{-0,15} \quad \text{Equação 5}$$

Em que, C é a concentração do analito expressa com a fração de massa decimal.

Para ser aceito o valor de Horrat deve ser inferior a 1,3 em estudos de validação intralaboratorial (AOAC, 2012; GONZALEZ et al., 2007).

#### 2.5.4 EXATIDÃO

A exatidão representa a proximidade dos resultados individuais obtidos pela análise das amostras e esse valor deve ser comparado a um material de referência para ser aceito como exato. Para avaliar a exatidão por comparação de métodos, são aplicados testes estatísticos, que incluem a regressão linear e o teste-t pareado (FREITAS et al., 2015; RIBANI et al., 2004; SILVA, 2012).

Como os materiais certificados são de difícil acesso para a maioria das amostras, pode-se utilizar a exatidão como aproximação dos resultados obtidos com amostras, comparando-as mesmas com as amostras padrão obtidas pela adição do analito na amostra branco. Assim como a precisão, a exatidão também é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método analítico e deve ser investigada após a determinação da seletividade, linearidade e precisão do método analítico (CASSIANO et al., 2009).



### **CAPÍTULO 3 – OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

### 3.1. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Atualmente, observa-se na literatura o interesse de muitos pesquisadores na determinação da composição mineral de sementes oleaginosas como a chia (WOJCIESZEK; POPOWSKI; RUZIK, 2016; BRITO et al., 2017; RUBIO et al., 2018). A análise de metais tem sido realizada preferencialmente pela espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente, o que exige a utilização da digestão assistida por micro-ondas para o preparo da amostra. Considerando a técnica de detecção e de preparo de amostra, ambas são de custo elevado, exigem analistas especializados e fazem uso de reagentes concentrados oferecendo menor segurança ao analista (NASCENTE, KORN e ARRUDA, 2001; KRUG, 2006; FREITAS et al., 2015). Em vista disso, o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra, como a extração assistida por ultrassom (ambientalmente amigáveis, rápidos e de baixo custo), torna-se interessante.

Mendivelso (2016) reportou o emprego da extração assistida por ultrassom para a análise de metais em chia fazendo uso de uma solução diluída de ácido nítrico 5% (v/v). Este solvente extrator se mostrou eficaz para a extração dos elementos Mg, Mn e Zn, porém para Fe, Cu e Ca foi observada a necessidade de estudos mais aprofundados para melhorar a extração dos mesmos.

No presente trabalho, levando-se em consideração as dificuldades observadas por Mendivelso (2016) na extração de metais da chia, inicialmente foi utilizado um planejamento de misturas simplex-centróide para encontrar a composição de solvente extrator capaz de extrair de forma eficiente um número maior de metais nesta matriz. Com este intuito, ácido nítrico 65% (v/v), peróxido de hidrogênio 35% (m/v) e água ultrapura foram adotados como vértices do planejamento de misturas.

## 3.2. METODOLOGIA

### 3.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.2.1.1. AMOSTRAGEM

Foram adquiridas amostras de sementes e de farinhas de chia de diferentes procedências, em supermercados, em estabelecimentos comerciais e em sítios eletrônicos no período de 2015 a 2017, as quais foram armazenadas em local arejado e seco até a realização dos ensaios. As amostras de chia (sementes e farinhas) foram, então, moídas no laboratório em um moedor de grãos e sementes oleaginosas (Cuisinard, modelo DCG-20BKN) e peneiradas até a granulometria de 425  $\mu\text{m}$  de acordo com a metodologia descrita por Mendivelso (2016). As amostras, após o processo de moagem e peneiramento, foram estocadas em frascos fechados de polipropileno e identificadas com letras de acordo com o tipo de apresentação (SC para semente de chia e FC para farinha de chia) e números por ordem de entrada no laboratório. Outras informações pertinentes e relativas às amostras são apresentadas na Tabela 1. Para o estudo de desenvolvimento da metodologia de extração assistida por ultrassom foi utilizada a amostra de farinha de chia identificada como FC3, a qual foi escolhida aleatoriamente dentre todas as amostras disponíveis para testes.

**TABELA 1:** INFORMAÇÕES DAS AMOSTRAS DE SEMENTES E DE FARINHAS DE CHIA AVALIADAS NO ESTUDO.

ID <sup>1</sup>	Procedência <sup>2</sup>	Lote
SC1	Londrina-PR	-
SC2	Guarujá do Sul-SC	0062
SC3	Bandeirantes-MS	00012814
SC4	São Paulo-SP	-
SC5	São Paulo-SP	-
SC6	Coronel Bicaco-RS	032016
SC7	Curitiba-PR	-
SC8	Curitiba-PR	150213
SC9	Curitiba-PR	-
SC10	São Paulo-SP	-
FC1	Jaraguá do sul-SC	12286
FC2	São Paulo-SP	-
FC3	Entre-Ijuis-RS	-
FC4	Chapecó-SC	-
FC5	Londrina-PR	-

ID<sup>1</sup>= Identificação das amostras de semente de chia (SC) e de farinha de chia (FC); <sup>2</sup>Local de processamento e envase das amostras.

### **3.2.1.2. REAGENTES**

Todas as soluções utilizadas ao longo do trabalho experimental foram preparadas empregando-se água ultrapura obtida através do equipamento Milli-Q (Advantage A10 Water Purification System ®) e reagentes de grau analítico: ácido nítrico 65% (v/v) (Emsure, Merck) e peróxido de hidrogênio 35% (m/v) (Neon). As soluções de Cu, Fe, Mn e Zn foram preparadas diariamente a partir de diluições de soluções padrão de 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol).

### **3.2.1.3. LIMPEZA DOS MATERIAIS**

A limpeza de todo o material utilizado nos experimentos consistiu inicialmente na lavagem destes com detergente e água, e enxague com água ultrapura. Em seguida, as vidrarias foram mantidas em banho de HNO<sub>3</sub> (10%, v/v) por um tempo mínimo de 24 horas. Posteriormente, estas foram enxaguadas com água ultrapura, e armazenadas em recipientes previamente descontaminados antes de serem utilizadas, evitando assim, possíveis contaminações.

### **3.2.1.4. EQUIPAMENTOS E PARÂMETROS INSTRUMENTAIS**

Os equipamentos utilizados no estudo foram balança analítica (Shimadzu, modelo AY220), micropipetas (Labmate-HTL, Kasvi basic) com diferentes volumes, chapa de aquecimento (Biomixer DB-IVAC), peneira de inox (Bertel abertura de 28 Mesh), moedor de café e grãos (Cuisinart, modelo DCG-20BKN), banho ultrassônico (Elmasonic P30H) e mufla (Spencer SP2707-21).

Para a determinação dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama – F AAS (Varian, modelo AA 220) e para a atomização foi empregada uma chama composta de ar/acetileno. Lâmpadas de cátodo oco (Luxan, Photron e Varian) foram adotadas empregando-se as condições recomendadas pelo fabricante do equipamento (Tabela 2). As curvas analíticas foram construídas, considerando a faixa linear de trabalho de cada elemento bem como os parâmetros operacionais descritos na Tabela 2.

**TABELA 2.** PARÂMETROS OPERACIONAIS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM AMOSTRAS DE SEMENTES E DE FARINHAS DE CHIA POR F AAS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>
Comprimento de onda (nm)	324,8	248,3	279,5	213,9
Corrente de lâmpada (mA)	5	5	15	5
Largura de fenda (nm)	0,5	0,2	0,2	1,0
Fluxo de acetileno (L min <sup>-1</sup> )	1,50	1,50	1,50	1,50
Fluxo de ar (L min <sup>-1</sup> )	3,50	3,50	3,50	3,50
Curva analítica (mg L <sup>-1</sup> )	0,1 – 0,5	0,4 – 2,0	0,2 – 1,0	0,2 – 1,6

### **3.3. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA O PREPARO DE AMOSTRA**

#### **3.3.1. DIGESTÃO POR VIA SECA**

Para a realização da digestão por via seca, pesou-se uma massa de 0,5 g de amostra de chia (previamente moída e peneirada, conforme descrito no item 3.1.) em uma cápsula de porcelana, a qual foi carbonizada em bico de Bunsen e posteriormente levada a mufla para a incineração a uma temperatura de 550 °C por 4 horas. Posteriormente, a amostra foi retirada da mufla, e às cinzas foi adicionado 1,0 mL de HNO<sub>3</sub> 65% (v/v) para auxiliar na finalização da incineração da matéria orgânica. Em seguida, a cápsula contendo as cinzas e o ácido nítrico foi levada para a chapa de aquecimento para a evaporação de compostos solúveis. Em seguida, a cápsula foi colocada novamente na mufla por mais 4 horas, para finalizar a incineração e permitir a eliminação da matéria orgânica. As cinzas resultantes foram, então, dissolvidas com 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> 65% (v/v), e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e avolumada com água ultrapura.

#### **3.3.2. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Para realizar a extração assistida por ultrassom, dos metais presentes na chia, foi pesada uma massa de 0,2 g de amostra, previamente moída e peneirada como descrito no item 3.1. com granulometria de 425 µm. Após, a mesma foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, sendo adicionada em seguida a mistura de 3,3 mL HNO<sub>3</sub> 65% (v/v) e 1,7 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (m/v). O tubo Falcon foi levado ao banho ultrassônico, e disposto de modo que se concentrasse na parte central do banho de ultrassom, onde a sonicação é mais efetiva. Para isso, um suporte elaborado com papelão foi utilizado para manter os tubos fixos no local desejado. O nível de água no

banho de ultrassom foi mantido acima do volume da mistura de solventes extratores que estavam contidos dentro do tubo Falcon. A sonicação foi realizada pelo tempo de 15 minutos utilizando uma frequência de 37 kHz, uma potência de 100W e na temperatura ambiente (25 °C). Após a sonicação, a mistura resultante foi filtrada diretamente em balão volumétrico de 25 mL utilizando papel de filtro qualitativo pregueado onde o papel utilizado tinha 16 pregas, e em seguida esta foi avolumada com água ultrapura.

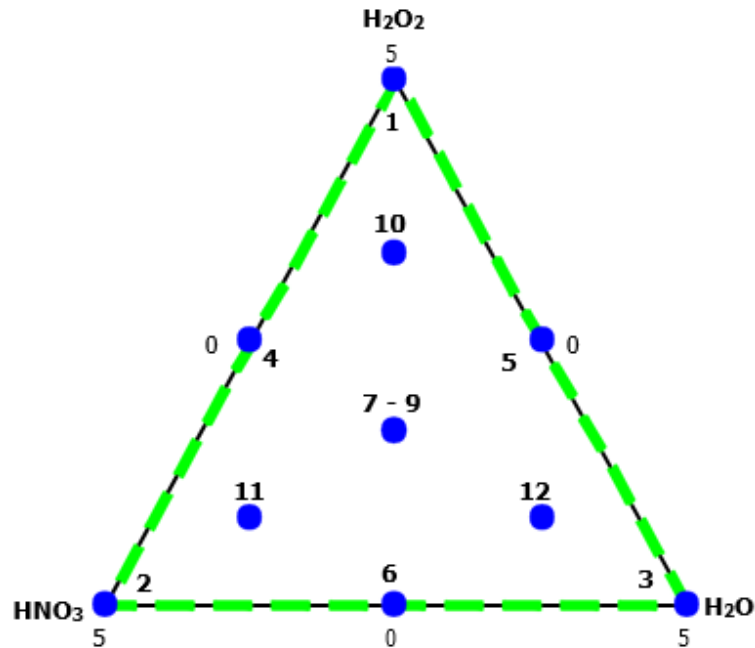
### **3.4. ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

#### **3.4.1. OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR POR PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTRÓIDE**

Antes de aplicar o planejamento de misturas, para avaliar se a distribuição das ondas ultrasônicas no banho de ultrassom era homogênea, foi aplicado o teste do papel alumínio de acordo com a metodologia descrita por Perônico (2014), durante 5 minutos, com a aplicação de frequência de sonicação de 37 kHz e potência de sonicação de 100W. Uma vez estabelecida a região de maior intensidade de sonicação dentro do banho de ultrassom, um planejamento de misturas do tipo Simplex-Centróide (S-C) foi aplicado a amostra FC3 (escolhida aleatoriamente), para determinar a melhor composição de solvente extrator na extração dos elementos Mn, Cu, Zn e Fe. Em todos os experimentos do planejamento de misturas foram utilizados um tempo de extração de 30 minutos, 0,4 gramas de amostra, uma frequência de sonicação de 37 kHz e uma potência de sonicação de 100W.

No planejamento de misturas a eficiência de extração dos solventes, ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) foi avaliada nos vértices (pontos 1, 2 e 3), nas misturas binárias destes solventes (pontos 4,5 e 6) e na mistura ternária (pontos 7 a 9) como descrito na Figura 2 e na Tabela 3. O planejamento foi ampliado, com três pontos internos igualmente distribuídos dentro de um triângulo equilátero (pontos 10, 11 e 12), para identificar de forma mais precisa efeitos sinérgicos ou antagônicos.

**FIGURA 2.** ILUSTRAÇÃO DOS PONTOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO S-C.



FONTE: A AUTORA (2018)

Nos pontos do vértice do planejamento de misturas (pontos 1, 2 e 3) foi utilizado um volume igual a 5,0 mL do respectivo solvente extrator (peróxido de hidrogênio, ácido nítrico e água). As misturas binárias e ternária, bem como os pontos internos do triângulo (Figura 2) foram obtidas de acordo com a matriz do planejamento de misturas apresentada na Tabela 3.

Como resposta do planejamento de misturas, foram utilizadas as taxas de extração de Mn, Cu, Fe e Zn, calculadas considerando a equação 6.

$$\text{Taxa de extração} = (C_{\text{EAU}}/C_{\text{DVS}}) * 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

$C_{\text{EAU}}$  = concentração do metal determinada pela extração assistida por ultrassom em  $\text{mg g}^{-1}$

$C_{\text{DVS}}$  = concentração do metal determinada pela digestão por via seca em  $\text{mg g}^{-1}$ .

**TABELA 3.** MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX-CENTRÓIDE.

Ensaio	Volume do Solvente Extrator (mL)		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O
1	5,00	0,00	0,00
2	0,00	5,00	0,00
3	0,00	0,00	5,00
4	2,50	2,50	0,00
5	2,50	0,00	2,50
6	0,00	2,50	2,50
7	1,67	1,67	1,67
8	1,67	1,67	1,67
9	1,67	1,67	1,67
10	3,33	0,83	0,83
11	0,83	3,33	0,83
12	0,83	0,83	3,33

Com o objetivo de se obter uma única combinação de solvente extrator para todos os metais avaliados, foi calculada a resposta global (RG) (NOVAES et al., 2017), a partir das taxas de extração dos metais para a matriz do planejamento de misturas descrito na Tabela 3, conforme a equação 7.

$$RG = [R(x1)/MR(x1) + R(x2)/MR(x2) + \dots + R(xn)/MR(xn)] \quad \text{Equação 7}$$

Em que R(xn) é a taxa de extração para um metal em um experimento do planejamento e MR(xn) é a maior taxa de extração no conjunto para aquele metal n.

Considerando que mesmo após a aplicação da extração assistida por ultrassom ainda haviam resíduos sólidos de chia dentro do tubo, as soluções foram submetidas a filtração em papel de filtro qualitativo liso e o filtrado foi transferido para balão volumétrico de 25 mL e aferido com água ultrapura. Em seguida, as soluções preparadas foram levadas ao equipamento de F AAS para a determinação dos metais avaliados.

Para determinar o modelo de regressão mais adequado para o planejamento proposto, a fim de maximizar as taxas de extração de metais em chia, foi aplicada uma análise de regressão linear e um teste de falta de ajuste (BARROS NETO, SCARMÍNIO E BRUNS, 2002), e os modelos linear, quadrático e cúbico especial, foram ajustados aos dados experimentais com o auxílio do software estatístico *Minitab for Windows* versão 16.2. (Minitab Co, USA, 2010). Para a avaliação dos modelos foram utilizados parâmetros da análise de regressão tais como o valor de  $F_{reg}$  para a regressão, o valor de  $F_{faj}$  para a falta de ajuste, valores de  $p$ , coeficientes de



determinação ( $R^2$  e  $R^2_{\text{ajust}}$ ), a raiz quadrada do quadrado médio do resíduo do modelo correspondente e os gráficos de resíduos (MYERS, MONTGOMERY E ANDERSON-COOK, 2001).

Além destes parâmetros foram obtidos também os coeficientes de regressão do modelo que melhor se ajustava aos dados (bem como seus efeitos), o gráfico de contorno referente ao planejamento de misturas e a região ótima do solvente extrator para maximizar as taxas de extração dos metais. Sendo assim, para determinar a composição ótima do solvente extrator para todos os elementos avaliados no estudo foi utilizada a função de desejabilidade. Esta função, apresenta as respostas individuais em uma escala adimensional de desejabilidades individuais ( $d_i$ ), variando de 0 (que representa uma resposta pouco eficiente ou inaceitável) a 1,0 (que representa a condição desejada). Com as desejabilidades individuais foi determinada a desejabilidade global (D), que é definida como a média geométrica das desejabilidades individuais ( $d_i$ ) de acordo com a equação 8 (NOVAES et al., 2017).

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots} \quad \text{Equação 8}$$

Em que:

m= número de respostas estudadas no processo de otimização

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left( \frac{y-L}{T-L} \right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases}$$

L= menor valor aceitável para a resposta

T= valor alvo

S= peso

A desejabilidade global (D) neste estudo foi utilizada como resposta para o planejamento de misturas simplex-centróide e teve o intuito de maximizar as taxas de extração dos metais investigados. Tendo em vista que se desejava obter taxas de extração próximas a 100%, foram atribuídos o mesmo peso (significância) para todos os metais avaliados neste estudo.

### 3.4.2. ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO UNIVARIADO

Após a escolha da melhor composição de solvente extrator, entre aquelas utilizadas na análise do planejamento de misturas, adotou-se aquela que apresentou a melhor resposta quanto a eficiência de extração dos metais Cu, Fe, Mn e Zn presentes na chia. Para isso, foram realizados estudos univariados, a fim de avaliar a influência de variáveis, como a massa de amostra e o tempo de sonicação, na extração de Cu, Mn, Zn e Fe. Durante todo o estudo univariado, fatores como frequência de sonicação (37 kHz), potência de sonicação (100 W) e volume do solvente extrator (5,0 mL) foram mantidos constantes.

Para o estudo univariado do tempo de sonicação foram estudados os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos, sendo que para cada tempo, as amostras foram preparadas em triplicata. Uma massa de 0,2 g foi empregada para a determinação de Fe, Cu, Mn e Zn em todos os ensaios.

Depois de determinar o melhor tempo de sonicação, foi realizado um estudo para avaliar qual a melhor massa de chia, utilizando massas entre 0,1 a 0,4 g, para todos os metais de interesse e empregando tempos de sonicação de 30 minutos, com o intuito de determinar qual razão massa/solvente extrator (1:50; 1:25; 1:16,7 e 1:12,5) seria mais efetiva na extração dos metais de interesse. Todos os ensaios foram realizados em triplicata,

Considerando todas as etapas que poderiam interferir de alguma forma nas taxas de extração dos metais, foram realizados testes para avaliar o melhor tipo de filtração da solução resultante da extração de metais da chia. Foram avaliados dois métodos: filtração com papel de filtro qualitativo liso e com o uso de papel de filtro qualitativo pregueado. Para este estudo, foram utilizadas massas de 0,2 g para a determinação de Fe Cu, Mn e Zn e tempo de extração de 15 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

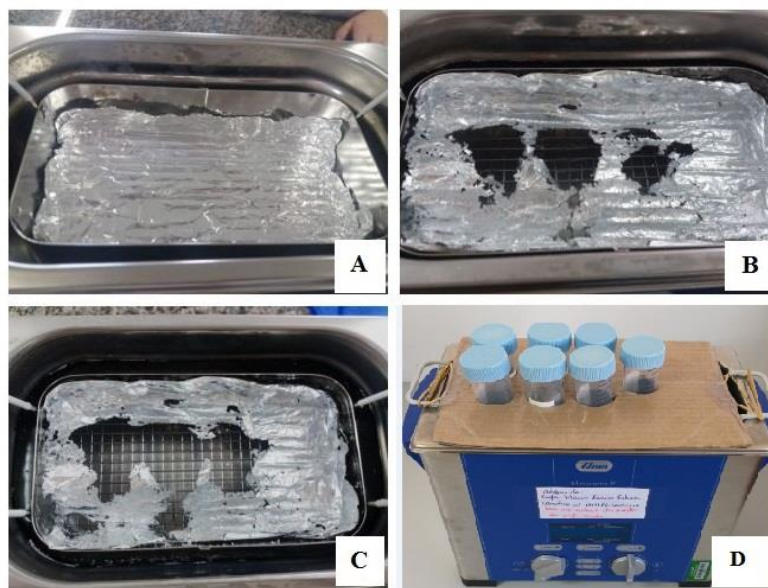
### **3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.5.1. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Antes de iniciar o procedimento de otimização da extração assistida por ultrassom de metais em chia, um estudo foi realizado com o propósito de verificar a região de sonicação mais efetiva, no banho ultrassônico. Foi realizado um teste com papel alumínio, de acordo com a metodologia descrita por Peronico (2014), que consiste em colocar o papel alumínio sobre a superfície interna do banho de ultrassom, adicionar água ultrapura e realizar a sonicação durante alguns minutos. Desta forma, é possível avaliar onde se encontram dispostos os transdutores dentro do banho de ultrassom, podendo-se avaliar em qual lugar a distribuição das ondas ultrassônicas e a sonicação se apresentam com maior homogeneidade e eficiência. Assim, estas regiões apresentarão melhores resultados na extração dos metais, com relação a outros locais dentro do banho ultrassônico. Como resultado do teste, podem ser verificadas perfurações no papel alumínio na região em que o banho de ultrassom apresenta a melhor área de sonicação (BENDICHO e LAVILLA, 2013).

Como observado na Figura 3, os pontos em que a sonicação se apresentou mais eficiente, quando realizado o teste do papel alumínio, foram localizados na parte central do banho ultrassônico. Desta forma, os tubos Falcon®, durante a extração foram concentrados na parte central do banho ultrassônico com o auxílio de um dispositivo de papelão para maior eficiência na extração dos metais avaliados.

**FIGURA 3** FOTO DO TESTE REALIZADO COM O PAPEL ALUMÍNIO PARA VERIFICAR A EFETIVIDADE DA SONICAÇÃO DO BANHO DE ULTRASSOM.



**FONTE:** A AUTORA (2018)

**LEGENDA:** (A) PAPEL ALUMÍNIO ANTES DA SONICAÇÃO; (B) PAPEL ALUMÍNIO APÓS UM MINUTO DE SONICAÇÃO; (C) PAPEL ALUMÍNIO APÓS 5 MINUTOS DE SONICAÇÃO; (D) DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS NO BANHO ULTRASSÔNICO.

Depois de definida a área em que a sonicação se apresenta mais eficiente, ou seja, a região central do banho de ultrassom, todos os experimentos de otimização e de validação do método de extração assistida por ultrassom de metais em chia, foram realizados dispondo os tubos Falcon na área de maior intensidade de sonicação, visando obter melhores resultados na extração (Figura 3-D).

Em seguida foi determinada a melhor composição do solvente extrator pela aplicação de um planejamento de misturas do tipo simplex-centroide, apresentado na Tabela 3, do item 3.4.1.

Na extração assistida por ultrassom, os analitos podem ser extraídos da matriz quando utilizadas soluções ácidas, pois a presença dos íons  $H^+$  em solução pode deslocar espécies metálicas da matriz sólida para a fase líquida (PERONICO E RAPOSO JR, 2015). Em vista disso, neste estudo foram utilizados como solventes extratores ácido nítrico 65% (v/v) ( $HNO_3$ ), peróxido de hidrogênio 35% (m/v) ( $H_2O_2$ ) e água ultrapura. O  $HNO_3$  é um ácido forte e um agente oxidante eficaz (KRUG, 2006). O mesmo tem o potencial de oxidar todos os metais que foram avaliados neste estudo. O  $H_2O_2$  foi escolhido pois apresenta alguns benefícios na sua utilização, como a formação de água como único produto de decomposição (KRUG, 2006). O  $H_2O_2$  ainda faz com que o  $HNO_3$  tenha seu potencial oxidante aumentado, justificando a sua

escolha como um dos componentes da mistura de solventes extratores. A intensidade de sonicação em água é maior do que em outros solventes, e isso se deve a sua densidade e viscosidade, ou seja, a viscosidade limita o movimento das bolhas de cavitação e por consequência diminui o contato da amostra com o solvente extrator. Desta forma, com a intenção de diminuir a viscosidade da solução a ser extraída foi utilizada a água como um dos componentes das misturas de solvente extrator, no planejamento de misturas (NASCENTES et al., 2001; CHEMAT et al., 2017). A matriz do planejamento e as taxas de extração dos metais avaliados para cada ensaio são apresentadas na Tabela 4.

A eficiência dos diferentes solventes extratores utilizados no planejamento de misturas foi avaliada mantendo-se constante o volume final de solvente (5,0 mL), o tempo de sonicação de 30 minutos e uma massa de chia de 0,4 g. A partir dos resultados da Tabela 4, pode-se observar que o ensaio 4, que fez uso da mistura binária de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi o que apresentou as maiores taxas de extração para os quatro metais avaliados. Dessa forma, pode-se dizer que há uma maior eficiência de extração em uma região comum para todos os metais avaliados. Por esse motivo, a análise do planejamento de misturas foi realizada a partir dos valores de resposta global (RG), apresentados na Tabela 4, com o intuito de obter a melhor composição de solvente extrator.

**TABELA 4.** RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR PARA A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE METAIS EM SEMENTES E FARINHAS DE CHIA.

Ensaio	Composição do Solvente Extrator			Taxas de Extração				Valores de RG
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	Cu	Fe	Mn	Zn	
1	5,00	0,00	0,00	0,0	0,28	23,4	21,9	0,440
2	0,00	5,00	0,00	53,9	60,6	94,5	106,5	3,640
3	0,00	0,00	5,00	0,0	0,0	0,0	4,1	0,035
4	2,50	2,50	0,00	62,5	67,4	102,4	110,4	3,985
5	2,50	0,00	2,50	0,0	0,0	2,01	5,1	0,064
6	0,00	2,50	2,50	50,5	56,7	87,9	101,8	3,415
7	1,67	1,67	1,67	51,8	57,3	90,6	93,3	3,621
8	1,67	1,67	1,67	62,4	56,3	89,9	102,4	3,870
9	1,67	1,67	1,67	63,7	64,8	99,2	103,9	3,415
10	3,35	0,83	0,83	26,5	37,7	63,3	69,7	2,221
11	0,83	3,35	0,83	59,4	67,3	100,9	106,6	3,875
12	0,83	0,83	3,35	32,9	38,5	69,7	76,5	2,460

RG= Resposta Global

É possível observar que a água, quando utilizada como único solvente extrator (ensaio 3 da Tabela 4) não foi eficiente para a extração de metais da amostra de chia, pois quando se compara o seu valor de RG (0,035), com os valores obtidos pelos outros solventes extratores (experimentos 1, 2, 4 a 12 com valores de RG entre 2,221 a 3,985), a mesma não se mostra eficiente para a extração de nenhum dos metais avaliados. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato da chia formar um gel transparente, firme e mucilaginoso, composto de fibras solúveis quando esta é adicionada a água, e este gel tem a capacidade de retê-la. Além disso, a chia apresenta em sua composição óleos e lipídeos, que são insolúveis em água, o que pode contribuir para que a água, quando aplicada como único solvente extrator, seja pouco efetiva na extração dos metais desta matriz (LIN, DANIEL, WHISTLER, 1994; MUÑOZ et al., 2012; DING et al., 2018; GARCÍA-SALCEDO et al., 2018).

Para a chia, a extração assistida por ultrassom foi menos efetiva para Cu e Fe, em comparação a Mn e Zn, quando se avalia o experimento 4 que forneceu as taxas mais altas de extração. Para verificar qual seria a melhor condição da extração assistida por ultrassom, com base no planejamento de misturas, foi aplicada uma Análise de Variância (ANOVA) aos valores de RG (Tabela 4), para definir qual modelo de regressão melhor se ajustaria aos dados. Três modelos foram testados (linear, quadrático e cúbico especial) e os resultados são apresentados na Tabela 5.

**TABELA 5.** ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS ESTATÍSTICOS GERADOS COM OS DADOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS.

<b>Modelo</b>	<b>SQ</b>	<b>g.l.</b>	<b>QM</b>	<b><math>F_{reg}</math></b>	<b>Valor de p</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>R^2_{ajust}</math></b>	<b>Raiz do QM<sub>resíduo</sub></b>
Linear*	16,0432	2	8,0216	6,94	0,015	0,0	51,9	1,075
Quadrático**	25,2290	5	5,0458	24,87	0,001	36,68	91,6	0,450
Cúbico especial***	25,8520	6	4,3087	36,24	0,001	37,46	95,0	0,345
Total	26,4465	11						

\* $F_{crítico(0,05;2,11)} = 2,81$ ; \*\* $F_{crítico(0,05;5,11)} = 2,39$ ; \*\*\* $F_{crítico(0,05;6,11)} = 2,33$ ; SQ= Soma Quadrática; g.l= Graus de Liberdade; QM= Quadrado Médio;  $F_{reg}$ = F de regressão;  $R^2$ = Coeficiente de Determinação;  $R^2_{ajust}$ = Coeficiente de determinação ajustado.

Os resultados da ANOVA mostraram que todos os modelos (linear, quadrático e cúbico especial) se ajustam aos dados, pois, os valores de  $F_{regressão} > F_{crítico}$ , e os valores de  $p < 0,05$ .

Para os modelos quadrático e cúbico especial, os valores de  $R^2_{ajust}$  foram maiores que 90%, indicando um ajuste adequado dos dados. Observando-se os valores apresentados na Tabela 5, constata-se que o modelo linear não se mostrou adequado para explicar o conjunto de dados, pois apresentou um baixo coeficiente de determinação (51,9%), mesmo apresentando regressão significativa no nível de 95% de confiança. Foi observado também que os valores da raiz do quadrado médio do resíduo dos modelos quadrático e cúbico especial se ajustam aos dados experimentais, pois quanto menor for esse valor melhor será o ajuste do modelo. Com o ajuste do modelo cúbico especial, por sua vez, uma mistura ternária de ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e água seria, provavelmente, a mais indicada para a extração dos metais de interesse em chia. No entanto, como verificado anteriormente, a adição de água, mesmo em pequenas proporções, pode auxiliar na extração dos metais pela redução da viscosidade do meio extrator, mas pode também induzir a formação de um gel mucilaginoso na chia, o que dificultaria o processo de extração devido ao aumento da viscosidade do meio e também a filtração do resíduo que permanece após o processo de extração por ultrassom. Desta forma, visando determinar qual dos modelos seria o mais adequado para explicar a extração de metais em chia por ultrassom, foi aplicado o teste  $F$  sugerido por Barros Neto, Scarminio e Bruns (2002), o qual é apresentado pela Equação 9.

$$F = \frac{SQR\ quad - SQR\ Cubi}{MQr\ Cubi} \quad \text{Equação 9}$$

Em que:

SQR quad= Soma quadrática do resíduo do modelo quadrático

SQR Cubi= Soma quadrática do resíduo do modelo cubico especial

MQr Cubi = Quadrado médio do resíduo do modelo cubico especial

Ao aplicar aos dados dos modelos quadrático e cúbico especial a equação 4, foi obtido um valor de  $F = 5,24$  o qual foi menor do que o valor de  $F_{critico} = 6,61$  no nível de 95% de confiança. Este resultado demonstra que apesar do modelo cúbico especial apresentar um melhor ajuste aos dados do planejamento de misturas ( $R^2_{ajust} = 95,0\%$ ) ele não contribui de forma significativa para explicar o comportamento dos solventes extratores e, portanto, o modelo quadrático pode ser utilizado.

Considerando todos estes aspectos, o modelo quadrático, o qual é um modelo mais simples do que o modelo cúbico especial foi escolhido para ajustar os dados do planejamento

de misturas. Na Tabela 6 é apresentada a Análise de Variância do modelo quadrático aplicado aos dados do planejamento proposto.

**TABELA 6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO.**

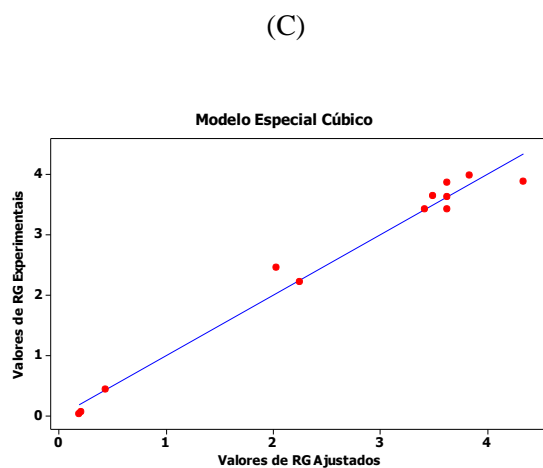
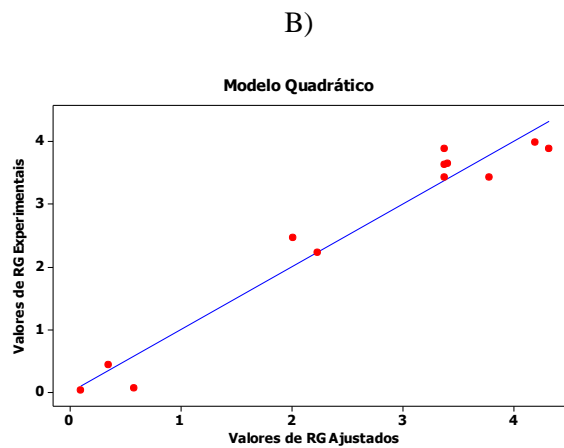
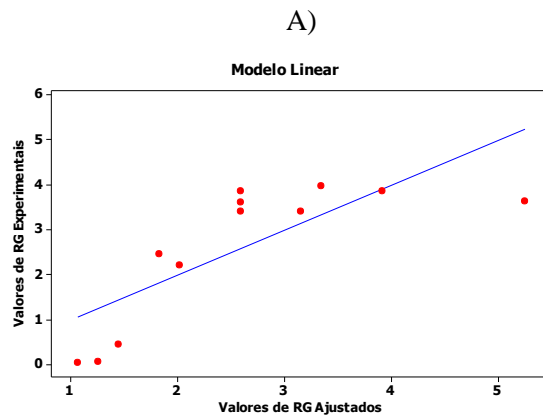
<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>g.l.</b>	<b>QM</b>	<b><math>F_{reg}</math></b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
Modelo Quadrático	25,2290	5	5,0458	24,87*	0,001
Erro total	1,2175	6	0,2029		
Falta de ajuste	1,1136	4	0,2784	5,36**	0,163
Erro puro	0,1038	2	0,0519		
Total	26,4465	11			

\* $F_{crítico(0,05;5,11)} = 2,39$ ; \*\* $F_{crítico(0,05;4,2)} = 19,20$ .  $SQ$ = Soma Quadrática;  $g.l$ = Graus de Liberdade;  $QM$ = Quadrado Médio;  $F_{reg}$ =  $F$  de regressão.

Os resultados da ANOVA mostraram que o modelo quadrático não apresenta falta de ajuste, pois  $F_{faj} < F_{crítico}$  e  $p > 0,05$ . Em vista disso, pode-se sugerir que o modelo quadrático é adequado para explicar o conjunto de dados, pois apresentou um coeficiente de determinação elevado ( $R^2 > 90\%$ ). O bom ajuste ao modelo de regressão quadrático também pode ser visualizado graficamente. A Figura 4 apresenta os valores de RG experimentais e os valores ajustados aos três modelos de regressão avaliados.



**FIGURA 4. GRÁFICOS DE VALORES DE RG EXPERIMENTAIS E VALORES DE RG AJUSTADOS PELO MODELO ESTATÍSTICO**



FONTE: A AUTORA (2018)

LEGENDA: MODELOS (A) LINEAR, (B) QUADRÁTICO E (C) CÚBICO ESPECIAL.

Analisando-se os gráficos de resíduos para os três modelos gerados (linear, quadrático e cúbico especial) pode-se verificar que os modelos, quadrático e cúbico especial, apresentam um bom ajuste aos dados do planejamento de misturas, uma vez que se observa que a dispersão dos dados é menor, quando comparada a do modelo linear. Como já mencionado anteriormente, o modelo cúbico especial apresentou um ajuste adequado dos dados, no entanto, o modelo quadrático é mais simples, pois apresenta menos termos, sendo, portanto o escolhido neste estudo.

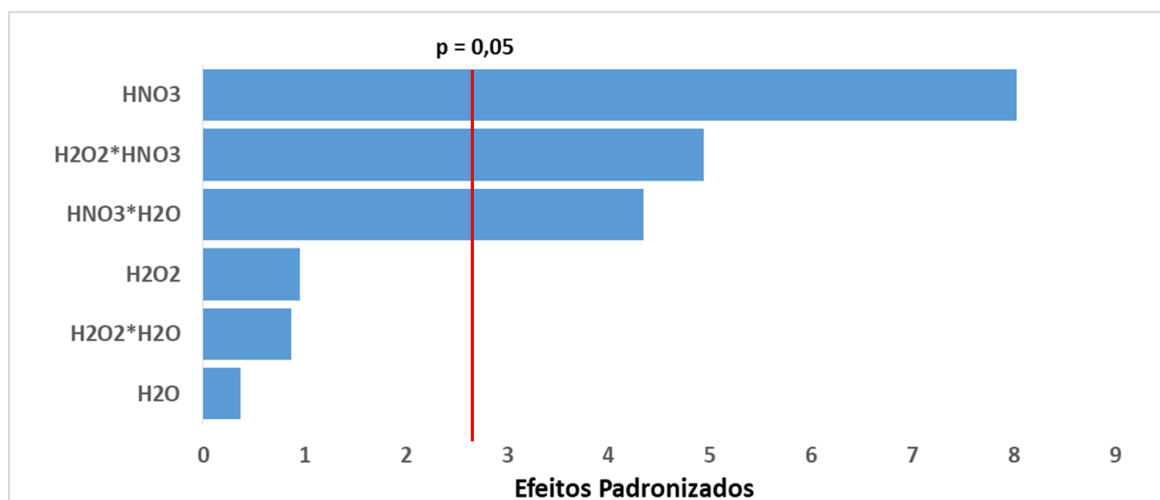
O modelo quadrático pode ser representado pela equação 10.

$$RG = 0,0696 (\pm 0,0360) x_1 + 0,6807 (\pm 0,0360) x_2 + 0,0194 (\pm 0,0360) x_3 + 0,3709 (\pm 0,1611) x_1x_2 + 0,3244 (\pm 0,1611) x_2x_3 + 0,0558 (\pm 0,1611) x_1x_3 \quad \text{Equação 10}$$

Em que:  $x_1$  = volume de  $H_2O_2$ ;  $x_2$  = volume de  $HNO_3$ ;  $x_3$  = volume de  $H_2O$ ;  $x_1x_2$  = interação entre  $H_2O_2$  e  $HNO_3$  e;  $x_2x_3$  = interação entre  $HNO_3$  e  $H_2O$ ;  $x_1x_3$  = interação entre  $H_2O_2$  e  $H_2O$ ; erros padrão dos coeficientes representados entre parênteses.

Um gráfico de Pareto foi construído para ilustrar os efeitos de cada solvente extrator presente na mistura, considerando o modelo quadrático ajustado (Figura 5).

**FIGURA 5.** GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTRÓIDE.



**FONTE:** A AUTORA (2018)

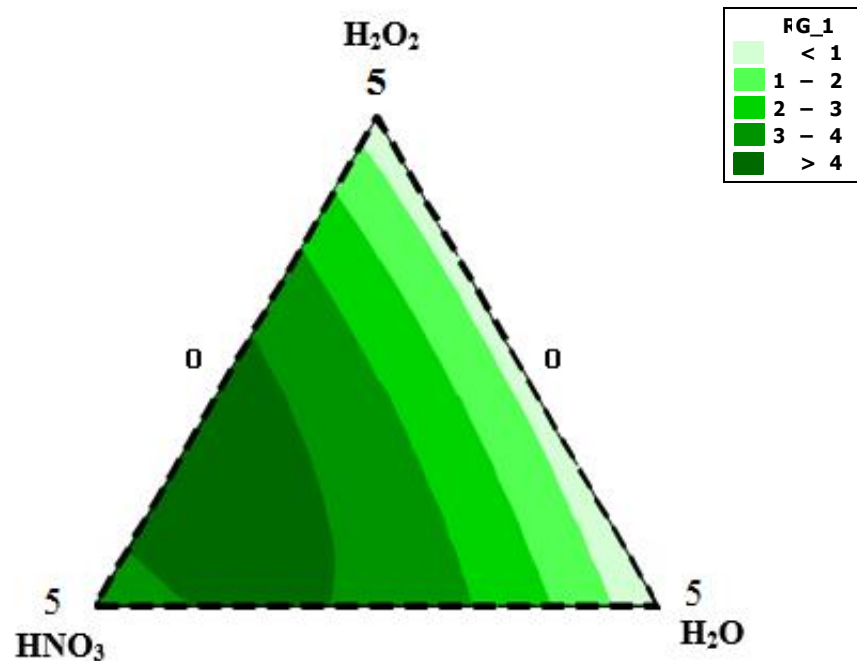
Analisando o gráfico de Pareto, é possível perceber que somente um componente da mistura, o ácido nítrico, bem como os efeitos de interação entre os solventes peróxido de hidrogênio e ácido nítrico e entre os solventes ácido nítrico e água são significativos no nível de 95% de confiança. Isso significa que o  $\text{HNO}_3$ , e os efeitos de interação entre os solventes citados, foram os solventes e/ou misturas de solventes, que apresentaram maior influência na extração dos metais nesta matriz proporcionando os valores mais elevados de RG.

A partir do planejamento de misturas, com os dados já ajustados ao modelo quadrático, foi possível também gerar um gráfico de contorno, mostrando as melhores condições experimentais com relação a composição do solvente extrator. O gráfico de contorno é apresentado na Figura 6.

O gráfico de contorno ilustra a região referente às combinações entre todos os solventes extratores utilizados, e sua eficiência frente a extração de Cu, Mn, Zn e Fe, sendo que os níveis representados de 0 a 5 são os volumes de cada um dos solventes, em mL, que foram utilizados no planejamento de misturas. Na Figura 6, é possível observar que a mistura de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , na região destacada com coloração verde escura, apresenta maior valor de resposta global (RG), ou seja, é a região onde é mais efetiva a extração dos elementos que estão ligados à matriz estudada.

Pode-se dizer que, em uma determinada região em comum, a extração assistida por ultrassom é mais eficiente para todos os metais avaliados. A construção do gráfico de contorno tinha como um dos objetivos encontrar a melhor composição de solvente extrator para todos os analitos de interesse.

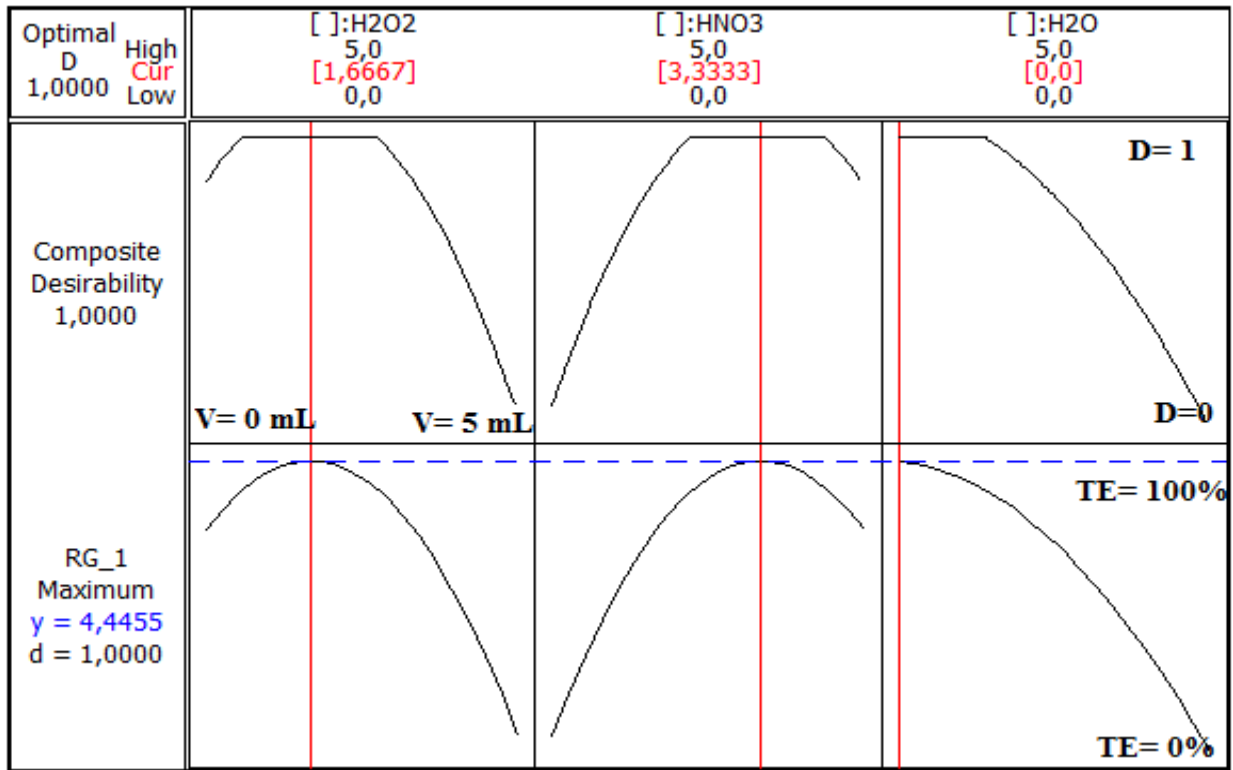
**FIGURA 6.** GRÁFICO DE CONTORNO DA SUPERFÍCIE GERADA PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROIDE CONSIDERANDO OS VALORES DE RG COMO RESPOSTA, EM QUE OS PONTOS DOS VÉRTICES SÃO REPRESENTADOS POR  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HNO}_3$  E  $\text{H}_2\text{O}$ .



FONTE: A AUTORA (2018)

Para encontrar a melhor composição de solvente extrator, a desejabilidade global nomeada (D) também foi avaliada, a fim de descobrir as melhores proporções de solvente extrator a serem utilizadas na mistura. Este método se baseia na definição de valores no intervalo entre 0 e 1 em que 0 é um valor inaceitável e 1 é o valor desejável, ou seja, a máxima desejabilidade (TEIXEIRA, 2012). Com o planejamento de misturas aplicado neste estudo, foi possível obter desejabilidade com valor igual a 1, como mostrado na Figura 7.

**FIGURA 7.** PERFIL DE OTIMIZAÇÃO BASEADO NOS VALORES DE DESEJABILIDADE PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTRÓIDE.



FONTE: A AUTORA (2018)

Em que:

V= Volume do solvente extrator que variou entre 0 a 5 mL;

D= Desejabilidade que variou entre 0 a 1;

TE= Taxa de extração dos metais que variou de 0 a 100%

Com base na Figura 7, pode-se observar que os valores de RG máximos foram obtidos utilizando-se na composição do solvente extrator, a proporção de 3,3 mL de HNO<sub>3</sub> e 1,7 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os patamares observados na Figura 6 referentes ao perfil de desejabilidade, para os solventes ácido nítrico e peróxido de hidrogênio que variam entre 0 e 5 mL, demonstram que pequenas alterações nos volumes destes solventes, não causam grandes alterações nos valores de desejabilidade global, bem como nos valores de RG previstos. Porém, se alterações significativas forem realizadas na composição do solvente extrator, ocorrerão perdas da efetividade das taxas de extração dos metais como pode ser observado em TE na Figura 7.

Visando alcançar taxas de extração próximas a 100% foi adotada a composição de solvente extrator definida pela função de desejabilidade.

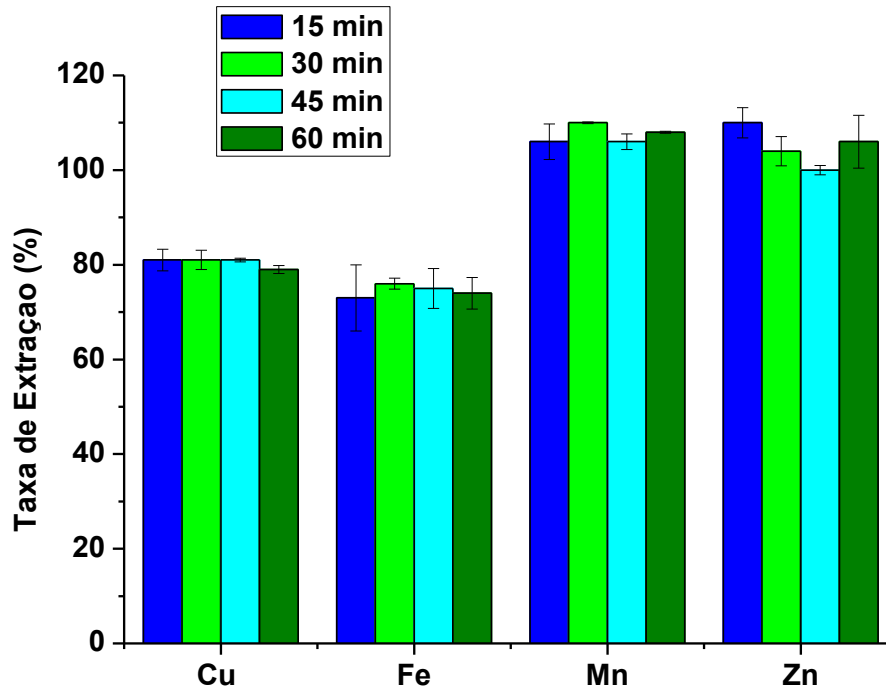
Sendo assim, com base na melhor composição do solvente extrator definida pela função de desejabilidade, de 3,3 mL de HNO<sub>3</sub> e 1,7 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi realizado um ensaio em triplicata, com os volumes previstos de solvente extrator, mantendo-se outras condições da extração constantes (massa de 0,4 g, tempo de sonicação de 30 min, frequência de 37 kHz e potência de 100 W). As taxas de extração (%) de Cu, Mn, Zn e Fe utilizando a composição de solvente extrator prevista pelo modelo quadrático e pela função de desejabilidade são apresentadas na Tabela 7.

**TABELA 7.** TAXAS DE EXTRAÇÃO E VALOR DE RG DOS ÍONS METÁLICOS AVALIADOS EM CHIA, EMPREGANDO A COMPOSIÇÃO DE SOLVENTE EXTRATOR PREVISTA DE 3,3 mL DE HNO<sub>3</sub> E 1,7 mL DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

<b>Taxas de Extração (%)</b>			
<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>
72,25 ± 3,95	68,34 ± 3,95	102,49 ± 6,28	103,13 ± 5,00

A composição de solvente extrator, definida como ótima pelo planejamento de misturas, apresentou taxas de extração em torno de 100% para Mn e Zn e em torno de 70% para Cu e Fe, confirmando assim o bom ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais. Porém, para Cu e Fe, não foi observada uma extração tão efetiva quando comparado ao valor esperado que é de 100%, sendo necessário um estudo mais aprofundado de outras condições experimentais da extração assistida por ultrassom. Neste sentido, foi realizado um estudo univariado, variando-se o tempo de sonicação e a massa de amostra de chia. Para isso, foram realizados quatro ensaios, em triplicata, variando-se primeiramente, o tempo de sonicação no banho de ultrassom, para observar como esse parâmetro poderia influenciar na extração dos metais. Os valores médios para as taxas de extração dos metais estudados são apresentados na Figura 7.

**FIGURA 8.** TAXAS DE EXTRAÇÃO MÉDIAS DE METAIS EM CHIA PARA O ESTUDO DO TEMPO DE SONICAÇÃO EM BANHO DE ULTRASSOM.



FONTE: A AUTORA (2018)

Como observado na Figura 8, Mn e Zn apresentaram taxas de extração que não diferiram entre os tempos avaliados e que se situaram em torno de 100%. Já os metais Cu e Fe apresentaram comportamento similar em relação ao tempo de extração, porém com taxas de extração em torno de 80%. Sendo assim, pode-se sugerir que nenhum dos tempos estudados apresentou melhora significativa nas taxas de extração dos metais em chia, quando estes são comparados entre si. Por essa razão, o tempo de sonicação escolhido foi de 15 min, pois o mesmo apresenta a mesma eficiência, quando comparado a tempos maiores de extração (30 – 60 minutos). O tempo para a extração dos metais no banho de ultrassom vai depender da matriz analisada e a forma como os elementos estão ligados a mesma, pois isso determinará se será necessário o uso de maior tempo de sonicação, maior massa de amostra ou o uso de solventes mais oxidantes fazendo com que haja a liberação do metal para a solução. Também é possível que sejam formados outros compostos durante a extração assistida por ultrassom que possam interferir na extração dos elementos desejados, especialmente quando os tempos de sonicação são mais longos. O uso de menores tempos de análise, sempre que possível, implica diretamente

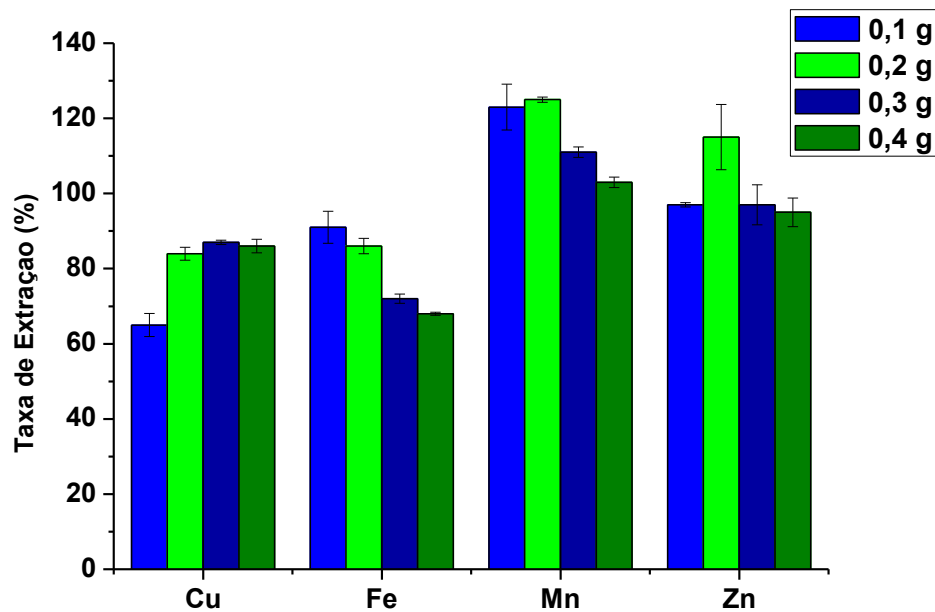
na frequência analítica do método, e no consumo de eletricidade para o funcionamento do banho de ultrassom. Mesmo com a utilização de menores tempos de sonicação no banho de ultrassom devido ao efeito ultrassônico mecânico a liberação dos analitos de interesse para a solução da extração é promovida, dessa forma aumentando a transferência de massa e facilitando o acesso do solvente ao conteúdo desejado (CHEMAT et al., 2017; BENDICHO e LAVILLA, 2013; COSTA, 2017).

Uma vez definida a composição do solvente extrator e o tempo de sonicação, foi realizado o estudo da influência da massa de amostra na extração assistida por ultrassom, pois para Fe e Cu, ainda não haviam sido observadas extrações efetivas (> 80%), quando comparadas as taxas de extração determinadas para Mn e Zn.

É reconhecido na literatura que as oleaginosas como a chia, apresentam teores variáveis de ácido fítico e o mesmo atua como um poderoso agente quelante, e reduz assim a biodisponibilidade de minerais que formam complexos insolúveis com ele. O ácido fítico e seus fitatos tem a capacidade de formar complexos com cátions bivalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Ca^{2+}$ ) e isso pode interferir na extração destes elementos em alguns alimentos (SANDBERG, 2002; SOUZA, 2003). Acredita-se que as menores taxas de extração observadas para Cu e Fe em comparação as determinadas para os metais Mn e Zn possam ser explicadas pela presença de fitatos e outros compostos conhecidos por complexar estes elementos.

Visando melhorar as taxas de extração, especialmente para Cu e Fe, foram realizados quatro ensaios, em triplicata, variando-se a massa de amostra de 0,1 a 0,4 g, e mantendo-se a composição do solvente extrator (3,3 mL de  $HNO_3$  e 1,7 mL de  $H_2O_2$ ) e o tempo de sonicação (15 min) constantes. Os dados referentes às taxas médias de extração dos metais e seus respectivos desvios padrão são apresentados na Figura 8.



**FIGURA 9.** TAXAS MÉDIAS DE EXTRAÇÃO DE METAIS EM CHIA PARA O ESTUDO DE MASSA.

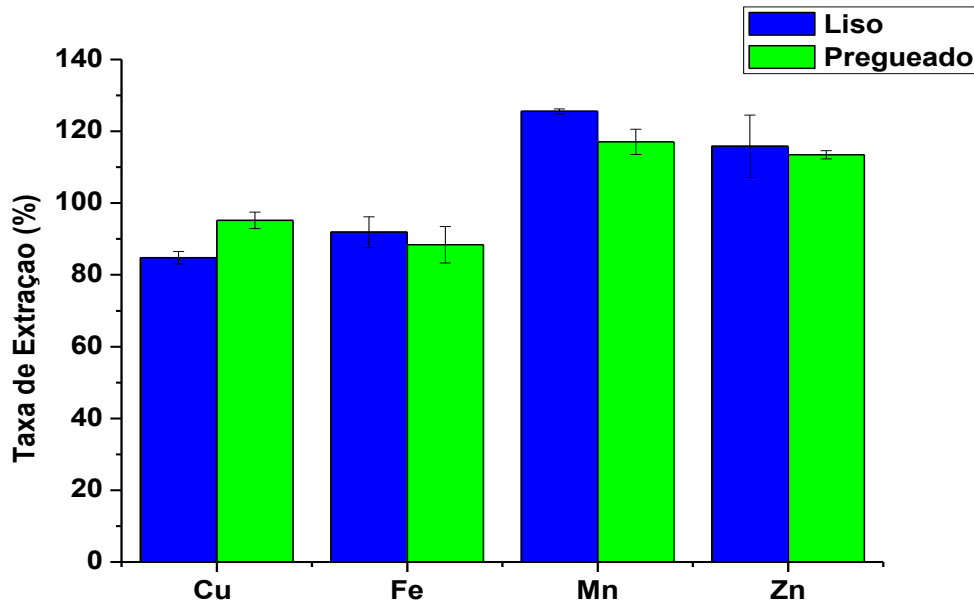
FONTE: A AUTORA (2018).

Com base na Figura 9, foi possível observar que as taxas de extração de Cu, Mn, Zn e Fe sofrem influência diferente das massas avaliadas. Por exemplo, para Mn, massas de 0,2 g produziram taxas de extração elevadas em relação ao uso de massas de 0,4 g. Para Fe, foram obtidas taxas de extração em torno de 91% e 86% com massas de 0,1 e 0,2 g, respectivamente, e taxas menores (< 80%) com massas de 0,3 e 0,4 g. Para Cu, massas de amostra iguais ou superiores a 0,2 g produzem taxas de extração em torno de 86%. Para Zn, poderiam ser utilizadas massas de amostra entre 0,1 e 0,4 g. Essa diferença de comportamento na extração dos metais em relação a massa utilizada, pode ser atribuída a forma como estes elementos estão ligados a matriz da chia. Na literatura, é reportado que Cu e Fe podem ser complexados fortemente por fitatos ou compostos fenólicos (ORONA-TAMAYO, VALVERDE; LÓPEZ; 2015, ORONA-TAMAYO, VALVERDE; LÓPEZ; 2017), os quais estão presentes na chia, sendo, portanto necessário melhorar a interação do solvente extrator com a amostra, para favorecer sua liberação para a solução da extração e melhorar a transferência de massa. É evidente, a partir da análise da Figura 9, que a massa de 0,2 g foi a que proporcionou as taxas de extração mais elevadas (> 80%) para todos os metais, especialmente para Fe e Cu. Com a utilização desta massa observa-se uma razão sólido/líquido (1:25) muito similar a reportada como ótima por outros autores que fizeram uso da extração assistida por ultrassom de amostras

sólidas (MARAN et al 2013, TADEO et al, 2010; ZU et al., 2012; CHARPE e RATHOD, 2016). Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que quando a amostra sólida é envolta pelo solvente líquido para a extração, essa se torna dependente do fenômeno de cavitação do banho de ultrassom e isso faz com que a solubilidade dos analitos no solvente extrator seja aumentada, e fazendo com que o solvente extrator atue diretamente nas partículas sólidas, especialmente quando se aumenta a razão sólido:líquido. Neste processo ocorre a fragmentação de partículas e os radicais gerados aumentam a oxidação da matéria orgânica, e isso faz com que a extração dos metais de amostras na fase sólida ocorra com maior facilidade e efetividade (BENDICHO e LAVILLA, 2013).

Considerando-se que após a extração assistida por ultrassom ainda havia partículas sólidas em suspensão na solução extraída, o método de filtração foi avaliado utilizando-se de papel de filtro qualitativo liso e pregueado. O tipo de filtração simples foi estudado considerando que a chia, em contato com soluções aquosas, forma um gel mucilaginoso que compacta dentro do funil, dificultando a filtração. Assim, foram realizados ensaios em triplicata utilizando o papel de filtro liso e o papel filtro pregueado para verificar se a etapa de filtração poderia interferir nos resultados de extração dos metais. Os resultados para este teste são apresentados na Figura 10.

**FIGURA 10.** EXTRAÇÃO DE METAIS EM CHIA UTILIZANDO DIFERENTES CONDIÇÕES DE FILTRAÇÃO DA SOLUÇÃO RESULTANTE.



**FONTE:** A AUTORA (2018).

A filtração completa com o papel de filtro liso levou em torno de 4 horas, enquanto que para a filtração com o papel de filtro pregueado, o tempo foi reduzido para 1 hora nas mesmas condições. Quando comparadas as taxas de extração, foi possível perceber uma melhora nos resultados quando se faz uso de papel de filtro pregueado, especialmente para Cu. Na filtração em papel de filtro liso, devido a compactação do resíduo dentro do funil durante a filtração, a mesma necessitou de um tempo maior para ser finalizada (aproximadamente 1h). Acredita-se que devido ao maior tempo de contato da solução da extração com o resíduo que resta dentro do funil durante a filtração com papel de filtro liso, elementos como o Cu possam estar se recombinando com a matéria orgânica ou ainda que parte da solução extraída contendo este metal esteja sendo retida no gel mucilaginoso, o que resulta em menores taxas de extração. Com a utilização do papel de filtro pregueado, o fenômeno de compactação do resíduo dentro do funil é diminuído, e estes efeitos são reduzidos, pois a filtração é mais rápida (aproximadamente 30 min). Desta forma, pode-se afirmar que a filtração com papel de filtro pregueado é mais efetiva quando comparada com a filtração com papel de filtro liso. Isso se deve ao fato de que

o papel de filtro pregueado aumenta a área da superfície de contato na filtração diminuindo o efeito de compactação no fundo do funil, e desta forma, acelerando o processo de filtração.

Considerando-se todas as variáveis analisadas, foram estabelecidas como melhores condições da extração assistida por ultrassom: composição de solvente extrator de 3,3 mL de  $\text{HNO}_3$  e 1,7 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,2 g de amostra, tempo de sonicação de 15 min e filtração com o uso de papel de filtro pregueado contendo 16 pregas.

**CAPITULO 4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR  
ULTRASSOM PARA A DETERMINAÇÃO DE CU, FE, MN E ZN EM CHIA POR F  
AAS**

## **4.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

Para as indústrias, o controle de qualidade é uma etapa muito importante, pois é a partir dele que se pode garantir que o produto possui segurança e adequabilidade. Na indústria alimentícia, o controle de qualidade está associado com a segurança alimentar, e neste sentido a validação de métodos torna-se um fator para regulação destes parâmetros (SOUZA, 2007).

Para garantir a qualidade dos resultados através do método analítico desenvolvido, o mesmo deverá ser avaliado por um processo de validação. A validação consiste em avaliar se o método é adequado e se o mesmo produz resultados confiáveis (PEREZ, 2010). A mesma deve ser aplicada sempre que se desenvolve um novo método analítico ou quando se modifica metodologias já validadas. No Brasil a validação de métodos analíticos é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Este último define validação como a comprovação, através de evidência objetiva, de quais requisitos para uso específicos pretendidos foram atendidos (RIBEIRO E FERREIRA, 2008; BRITO *et al.*, 2003; ABNT NBR ISO/IEC 17025; INMETRO, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2008; BRASIL, 2016).

A validação de métodos é um requisito importante para a prática da análise química, pois quando o método não é confiável, pode por em risco toda a análise e seus resultados. Os parâmetros de validação, também conhecidos como figuras de mérito, geralmente avaliados são linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez (INMETRO, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2008; SOUZA, 2007; EURACHEM, 2014).

## **4.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1. CURVAS ANALÍTICAS E LINEARIDADE**

As curvas analíticas para a quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn empregando a extração assistida por ultrassom e F AAS para análise de sementes e de farinhas de chia pode ser obtida por métodos distintos. Neste trabalho, as curvas analíticas utilizadas foram a de adição de padrão (AP), a de padronização externa em meio aquoso (PE-AQ) e a de padronização externa em meio extrator (PE-ME). O emprego das mesmas foi necessário para verificar se haviam

efeitos da matriz da chia ou do solvente extrator nas determinações dos metais de interesse (ANDRADE *et al.*, 2014; FERREIRA, 2016; GALVÃO, 2016).

Para Cu, as faixas de concentração estudadas na calibração foram de 0,1 a 0,5 mg L<sup>-1</sup>, para Cu, de 0,4 a 2,0 mg L<sup>-1</sup> para Fe, de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> para Mn e de 0,2 a 0,6 mg L<sup>-1</sup> para Zn. Foram utilizados três procedimentos distintos para o preparo das curvas analíticas nessas faixas de concentração. O primeiro método de calibração foi o de padronização externa em solução aquosa (PE-AQ), em que as soluções de referência de todos os elementos investigados foram preparadas com concentração conhecida em solução aquosa, a partir da diluição de uma solução padrão estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol) diluída em água ultra pura. As curvas de padrão externo em meio extrator (PE-ME) foram obtidas através da adição de 3,3 mL de HNO<sub>3</sub> e 1,7 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos padrões metálicos, sendo que as soluções resultantes foram posteriormente submetidas a extração por ultrassom durante 15 minutos adotando amplitude de 100 W e frequência de sonicação de 37 kHz. As curvas de adição de padrão (AP) foram construídas através do enriquecimento com concentrações conhecidas dos padrões metálicos da solução de chia resultante da extração assistida por ultrassom utilizando o procedimento otimizado.

A linearidade foi avaliada, pela aplicação da regressão linear e de um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança utilizando o software Minitab for Windows v.16.2.2 (MINITAB, 2010). Para avaliar a significância dos coeficientes linear e angular das curvas analíticas foi aplicado um teste-*t* no mesmo nível de confiança.

#### **4.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)**

Os valores de LD e de LQ foram obtidos pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, utilizando a curva de padrão externo em meio aquoso (PE-AQ). Para o cálculo foram realizadas 10 medidas do controle analítico (branco) e aplicadas as equações 1 e 2, apresentadas no item 2.7.2 (ICH, 1996; RIBANI *et al.*, 2004; NATA, 2018).

#### **4.2.3. PRECISÃO**

A precisão do método desenvolvido para a extração assistida por ultrassom de metais em chia foi avaliada por meio da análise das estimativas de repetitividade (Rep) (por extrações e medidas realizadas no mesmo dia e nas mesmas condições) e de precisão intermediária (PI)

(por extrações e medidas realizadas em quatro dias consecutivos) através do cálculo dos respectivos desvios padrões relativos (DPR). Para os testes de repetitividade e de precisão intermediária foram preparadas amostras como descrito no item 2.7.3 em duplicata, e realizadas as medidas dos quatro metais (Cu, Fe, Mn e Zn) na amostra de chia, por F AAS. Uma Análise de Variância de um fator foi realizada e os resultados foram utilizados para o cálculo dos valores de DPR (%).

A precisão também foi expressa em valores de Horrat, os quais foram calculados conforme descrito no item 2.7.3 (AOAC, 2012; GONZÁLES et al., 2007; GALVÃO, 2017).

#### **4.2.4. EXATIDÃO**

A exatidão do método proposto para a determinação de metais em chia foi avaliada por meio da comparação entre os resultados da extração assistida por ultrassom e do método de referência adotado (digestão por via seca). Foram escolhidas quatro amostras para avaliação da exatidão, sendo duas de farinhas de chia (FC1 e FC2) e duas de sementes de chia (SC1 e SC2). As amostras foram preparadas em triplicata para cada método de preparo de amostra e foram analisadas por F AAS, aplicando-se aos resultados um teste-*t* pareado com auxílio do software Minitab for Windows v.16.2.2 (MINITAB, 2010) (THOMPSON et al., 2002).

#### **4.3. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE CHIA**

A aplicação da metodologia otimizada e validada de extração assistida por ultrassom para a determinação de metais em chia foi realizada em dez amostras sendo cinco de farinhas (FC1 a FC5) e cinco de sementes (SC1 a SC5). As amostras foram preparadas em triplicatas e determinadas por F AAS.

Para verificar se os resultados obtidos estavam em concordância com o que é permitido/recomendado nas legislações brasileiras com relação a contribuição nutricional foram analisados os valores de ingestão diária recomendada (IDR) para cada metal analisado de acordo com o estabelecido na legislação brasileira (BRASIL, 2006).



## 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1. CURVAS ANALÍTICAS E LINEARIDADE

Inicialmente, as curvas analíticas para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em chia, foram obtidas por padronização externa em solução aquosa (PE-AQ) e por padronização externa em meio extrator (PE-ME). O estudo foi realizado para verificar se os solventes extratores utilizados para a extração dos metais da chia, poderiam ser uma fonte de interferências nas análises utilizando a técnica de F AAS. Os dados das curvas analíticas, avaliadas em cada meio de interesse, para os quatro elementos avaliados, são apresentados na Tabela 8.

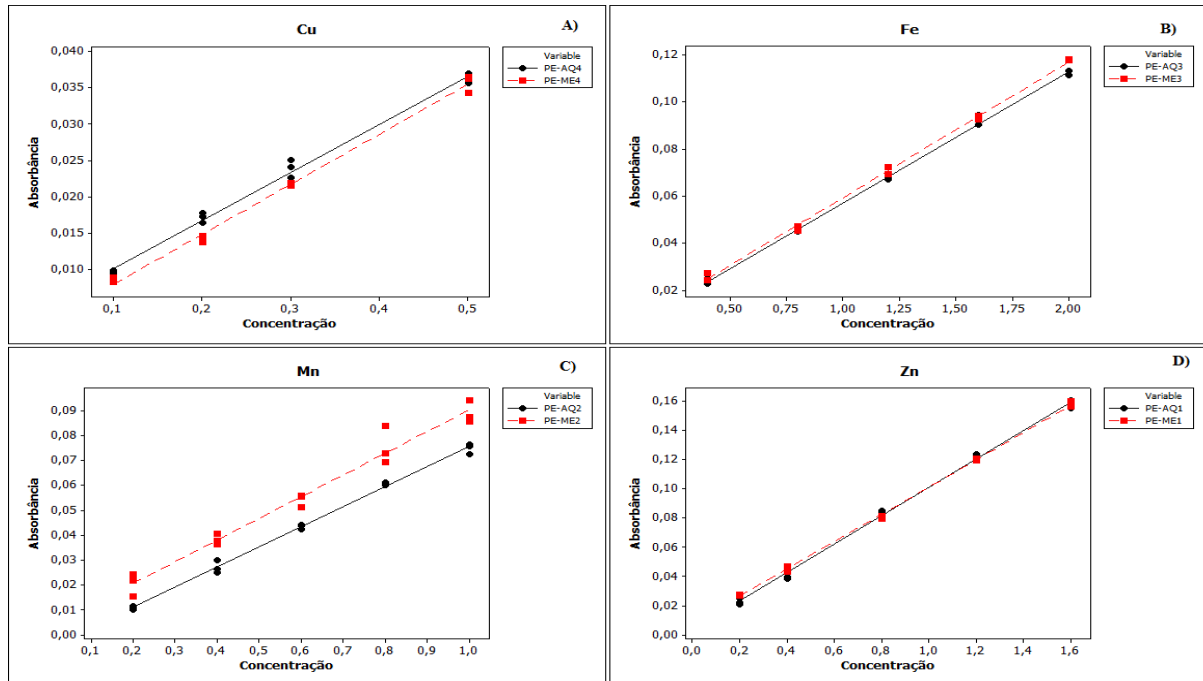
**TABELA 8.** PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS EMPREGANDO AS CURVAS DE PADRÃO EXTERNO AQUOSO (PE-AQ) E DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO EXTRATOR (PE-ME).

Metal	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	Tipo de calibração	Equação*
<b>Cu</b>	0,1 – 0,5	PE-AQ	A= 0,0034 + 0,0666 (± 0,0039)*
		PE-ME	A= 0,0010 + 0,0691 (± 0,0034)*
<b>Fe</b>	0,4 – 2,0	PE-AQ	A= 0,0011 + 0,0559 (± 0,0022)*
		PE-ME	A= 0,0016 + 0,0576 (± 0,0022)*
<b>Mn</b>	0,2 – 1,0	PE-AQ	A= - 0,0052 + 0,0809 (± 0,0030)*
		PE-ME	A= 0,0031 + 0,0871 (± 0,0085)*
<b>Zn</b>	0,2 – 1,6	PE-AQ	A= 0,0034 + 0,0975 (± 0,0031)*
		PE-ME	A= 0,0076 + 0,0932 (± 0,0020)*

\*Intervalo de confiança (IC) calculado para os coeficientes angulares de cada curva analítica.

Quando comparados os intervalos de confiança dos coeficientes angulares das curvas analíticas de PE-AQ e PE-ME (Tabela 8) para cada elemento analisado, é possível verificar que não há diferenças significativas de inclinação entre as curvas construídas devido a sobreposição dos intervalos de confiança para as curvas de PE-AQ e PE-ME. Isso demonstra que o meio extrator não apresenta interferências na quantificação dos metais avaliados. Assim, as curvas analíticas de padrão externo em meio aquoso (PE-AQ) poderiam ser utilizadas para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em chia, empregando F AAS, considerando que não houve diferenças na inclinação das curvas analisadas. Isso também pode ser observado graficamente, como mostra a Figura 11, para as curvas analíticas de cada metal construídas nos dois meios avaliados.

**FIGURA 11.** CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO AQUOSO (PE-AQ) E DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO EXTRATOR (PE-ME) PARA A DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA POR F AAS.



FONTE: A AUTORA (2019).

No entanto, a adição da matriz ao meio, pode interferir nos valores de absorbância dos metais de interesse e produzir curvas analíticas com inclinações diferentes. Por isso, as curvas analíticas de padrão externo em meio aquoso (PE-AQ) foram novamente avaliadas, agora em relação às curvas com adição de padrão (AP) em matriz de sementes de chia, as quais foram previamente submetidas ao processo de extração assistida por ultrassom. Os dados das curvas analíticas obtidas para cada metal, em cada meio avaliado, são apresentadas na Tabela 9.

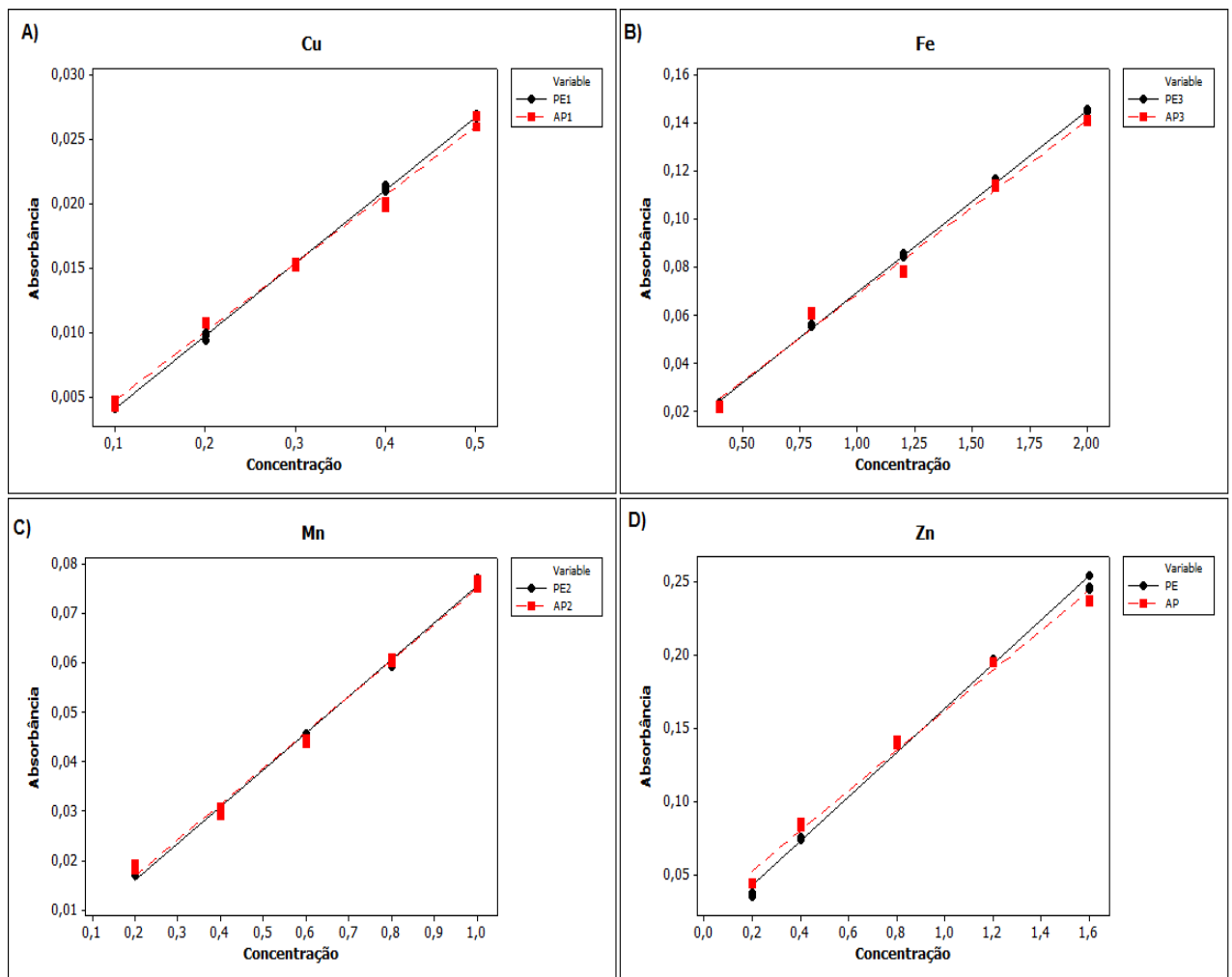
**TABELA 9.** PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn POR F AAS EMPREGANDO AS CURVAS DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO AQUOSO (PE-AQ) E DE ADIÇÃO DE PADRÃO (AP).

Metal	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	Tipo de calibração	Equação*
Cu	0,1 – 0,5	PE-AQ	A= -0,0016 + 0,0568 (± 0,0008)*
		AP	A= -0,0006 + 0,0533 (± 0,0025)*
Fe	0,4 – 2,0	PE-AQ	A= -0,0061 + 0,0759 (± 0,0014)*
		AP	A= -0,0040 + 0,0728 (± 0,0043)*
Mn	0,2 – 1,0	PE-AQ	A= 0,0011 + 0,0747 (± 0,0022)*
		AP	A= 0,0022 + 0,0730 (± 0,0032)*
Zn	0,2 – 1,6	PE-AQ	A= 0,0124 + 0,151 (± 0,007)*
		AP	A= 0,0250 + 0,137 (± 0,008)*

\*Intervalo de confiança (IC) calculado para os coeficientes angulares de cada curva.

Com relação à Tabela 9, ao se comparar os coeficientes angulares e seus respectivos intervalos de confiança das curvas analíticas de PE-AQ e AP (Tabela 9) para cada elemento determinado, é possível verificar que não existem diferenças significativas nas inclinações entre as curvas. Isso demonstra que a matriz da chia não causa interferências na quantificação dos metais avaliados. Portanto, novamente, as curvas analíticas de padrão externo em meio aquoso (PE-AQ) demonstram ser adequadas para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em chia, empregando-se F AAS. Isso também pode ser observado graficamente, como mostra a Figura 12, para as curvas analíticas de cada metal nos dois meios avaliados. A calibração utilizando padronização externa em meio aquoso apresenta grandes vantagens para a metodologia desenvolvida, pois aumenta a frequência analítica e diminui os custos da análise (ANDRADE *et. al.*, 2014, GALVÃO, 2017).

**FIGURA 12.** CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO AQUOSO (PE-AQ) E ADIÇÃO DE PADRÃO (AP) PARA A DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA POR F AAS.



FONTE: A AUTORA (2019)

Para avaliar a linearidade da curva analítica de padrão externo foi aplicada uma análise de regressão linear e o teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança (Tabela 10).

**TABELA 10.** RESULTADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR DA CURVA ANALÍTICA PE-AQ, PARA O ESTUDO DA LINEARIDADE NA DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn e Zn EM CHIA POR F AAS.

Metal	Parâmetros de Regressão		Regressão		Falta de ajuste	
	R	R <sup>2</sup>	F <sub>reg</sub>	Valor de p	F <sub>Faj</sub>	Valor de p
<b>Cu</b> <sup>a</sup>	0,9933	99,3	1477,39	0,000	2,05 <sup>d</sup>	0,191
<b>Fe</b> <sup>b</sup>	0,9977	99,7	3415,53	0,000	1,40 <sup>e</sup>	0,345
<b>Mn</b> <sup>c</sup>	0,9961	99,6	3340,81	0,000	1,00 <sup>f</sup>	0,433
<b>Zn</b> <sup>c</sup>	0,9972	99,7	4713,12	0,000	2,11 <sup>f</sup>	0,162

<sup>a</sup> F crítico(0,05; 1,10)=4,67; <sup>b</sup> F crítico (0,05;1,8)= 5,32; <sup>c</sup> F crítico (0,05;1,13)=4,67; <sup>d</sup> F crítico (0,05;1,8)=4,46; <sup>e</sup> F crítico (0,05;1,8)=5,41; <sup>f</sup> F crítico (0,05;1,8)=3,71.

Em relação à Tabela 10, é possível observar que nas análises de regressão linear de Cu, Fe, Mn e Zn os valores de  $F_{reg} \gg F_{crítico}$ , com valores de  $p < 0,05$ ; portanto a regressão linear é significativa. Para confirmar a linearidade das curvas analíticas foi aplicado um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança, sendo que os resultados variaram de 1,00 (Mn) a 2,11 (Zn). Em todos os casos, os valores de  $F_{faj} < F_{crítico}$ , com valores de  $p > 0,05$ , indicando que não foi observada falta de ajuste do modelo linear no nível de confiança estudado. Isso demonstra que as curvas analíticas de padrão externo apresentam linearidade na faixa de concentração investigada.

Os elevados valores dos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) indicaram que mais de 90% dos dados experimentais são explicados pelo modelo linear e o restante pode ser atribuído aos resíduos (FREIRE et al., 1999). O coeficiente de correlação ( $r > 0,99$ ) das curvas analíticas de padrão externo para todos os elementos estudados demonstrou haver uma relação linear entre a absorvância e a concentração dos metais (BRASIL, 2018; ARAÚJO, 2009).

Para avaliar a significância dos coeficientes linear (parâmetro  $a$ ) e angular (parâmetro  $b$ ) das curvas analíticas ( $y = a + bx$ ) de padrão externo em meio aquoso foi aplicado um teste- $t$  no nível de 95% de confiança (Tabela 11).

**TABELA 11.** AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO PARA Cu, Fe, Mn e Zn.

Curva Analítica	Parâmetro $a$		Parâmetro $b$	
	$t_{calculado}^*$	$p$ -valor	$t_{calculado}^{**}$	$p$ -valor
Cu <sup>a</sup>	6,37 <sup>a</sup>	0,000	38,44 <sup>a</sup>	0,000
Fe <sup>b</sup>	0,85 <sup>b</sup>	0,417	58,44 <sup>b</sup>	0,000
Mn <sup>c</sup>	5,57 <sup>c</sup>	0,000	57,80 <sup>c</sup>	0,000
Zn <sup>c</sup>	2,47 <sup>c</sup>	0,028	68,65 <sup>c</sup>	0,000

<sup>a</sup>  $t_{crítico} (0,025;10) = 2,23$ ; <sup>b</sup>  $t_{crítico} (0,025;8) = 2,31$ ; <sup>c</sup>  $t_{crítico} (0,025;13) = 2,16$ .

Observando os resultados da Tabela 11 é possível afirmar que o parâmetro  $b$  (coeficiente angular) é significativo para todas as curvas analíticas avaliadas, pois os valores de  $t_{calculado} > t_{crítico}$ , com valores de  $p < 0,05$ . Com relação ao coeficiente linear, os resultados indicaram que este é significativo para as curvas de Cu, Mn e Zn, pois os valores de  $t_{calculado} > t_{crítico}$ , com valores de  $p < 0,05$ . Já para a curva de Fe, o parâmetro  $a$  (coeficiente linear) não é significativo, pois o valor de  $t_{calculado} (0,85) < t_{crítico} (2,31)$ , com valor de  $p = 0,417 (> 0,05)$ , indicando que a curva analítica passa pela origem ( $a = 0$ ).

Desse modo, as curvas de padrão externo para Cu, Mn e Zn podem ser representadas na forma de  $y = a + bx$ , enquanto que a curva analítica de Fe deve ser representada como  $y = bx$ .

Após o estudo da linearidade das curvas analíticas, foram calculados os limites de detecção e de quantificação para cada metal estudado.

#### 4.4.2. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os valores de LD e de LQ estão fortemente ligados à sensibilidade do método. O LD é a concentração mínima do analito que o equipamento pode detectar. O LQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Para avaliar se o método desenvolvido possibilitaria a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de chia que apresentassem baixas concentrações, os limites de detecção e de quantificação foram calculados. Neste trabalho, os valores de LQ e de LD foram determinados através das

estimativas de desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico (branco) e da inclinação (coeficiente angular) da respectiva curva analítica (BRITO et al., 2003; ANVISA, 2017). Sendo assim, os limites foram determinados de acordo com as equações do item 2.7.2, para os dois métodos de preparo de amostras utilizados (extração assistida por ultrassom e digestão por via seca) como forma de avaliar a sensibilidade dos métodos de preparo de amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

**TABELA 12.** LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO PARA OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E DIGESTÃO POR VIA SECA.

<b>Limites de Detecção e de Quantificação em (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>				
<b>Metal</b>	<b>Extração Assistida por Ultrassom</b>		<b>Digestão por Via Seca</b>	
	<b>LD</b>	<b>LQ</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>
Cu	1,3	5,6	0,3	0,9
Fe	1,3	4,2	1,6	5,5
Mn	0,5	1,8	0,2	0,7
Zn	4	13	1,3	4,3

Os valores de LD e de LQ foram relativamente baixos, considerando que os mesmos foram inferiores ao primeiro ponto das curvas analíticas.

Os valores de LD variaram de 0,5 a 4 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), seguindo a sequência de Mn < Fe < Cu < Zn para a extração assistida por ultrassom e de 0,2 a 1,6 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) seguindo a sequência de Mn < Cu < Zn < Fe para a digestão por via seca.

Os valores de LQ variaram de 1,8 a 13 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), seguindo a sequência de Mn < Fe < Cu < Zn para a extração assistida por ultrassom, e de 0,7 a 5,5 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) seguindo a sequência de Mn < Cu < Zn < Fe para a digestão por via seca.

Assim, assume-se que os analitos podem ser quantificados com precisão e exatidão adequadas, na faixa linear das concentrações investigadas. Isso indica que o método desenvolvido é sensível para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em farinhas e em sementes de chia por F AAS. Para avaliar a detectabilidade e quantificação confiável dos metais em chia, através da metodologia desenvolvida, os valores de LD e de LQ determinados neste trabalho foram comparados aos valores de LD e LQ obtidos em outros estudos disponíveis na literatura, os quais são apresentados na Tabela 13.

**TABELA 13.** VALORES DE LD E LQ ENCONTRADOS NA LITERATURA, REFERENTES A DETERMINAÇÃO DE METAIS NA CHIA POR ICP-MS E ICP- OES.

Metal	* ICP- MS	$\mu\text{g g}^{-1}$	** ICP-OES	$\mu\text{g g}^{-1}$
	LD	LQ	LD	LQ
Cu	0,04 (0,33 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,14 (1,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,02 (4 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,06 (12 $\mu\text{g l}^{-1}$ )
Fe	-	-	0,01 (2 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,04 (8 $\mu\text{g l}^{-1}$ )
Mn	0,07 (0,59 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,24 (1,9 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,01 (2 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,04 (8 $\mu\text{g l}^{-1}$ )
Zn	0,15 (1,2 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,5 (4,0 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,01 (2 $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,035 (7 $\mu\text{g l}^{-1}$ )

\*Wojcieszek et al., (2016); \*\*Rubio et al., (2018). ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )

Os valores encontrados para LD e LQ em outros estudos, demonstram que existem diferenças, quando comparados aos limites determinados no presente trabalho. Porém, a extração assistida por ultrassom aliada a técnica de F AAS, apresenta-se como um método mais rápido, sendo que os valores de LD e LQ mais elevados para a metodologia desenvolvida se devem a técnica de F AAS não ser tão sensível quanto as técnicas como ICP-OES e ICP-MS. Além disso, os reagentes utilizados na extração (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio) podem ainda contribuir para a elevação dos valores dos brancos analíticos e por sua vez para os valores de LD e LQ. No entanto, isso não compromete a qualidade do resultado para estes parâmetros.

Os resultados apresentados por Mendivelso (2016) também mostraram valores de LD e LQ mais baixos quando comparados com este trabalho. Foram obtidos valores de LD/LQ de 0,8/1,75 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e 2,7/5,9 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para Mn e Zn, respectivamente. Estes valores podem ser explicados pelo fato da metodologia de Mendivelso fazer uso de uma solução extratora mais diluída (solução de  $\text{HNO}_3$  5% (v/v)) do que a adotada neste estudo (solução de  $\text{HNO}_3$  13,2% (v/v)) e sem a presença de peróxido de hidrogênio. Uma concentração mais elevada dos solventes extratores pode ter contribuído para o aumento dos valores de LD e de LQ determinados em relação ao trabalho reportado por Mendivelso (2016). Apesar disso, os valores observados para os limites neste trabalho foram considerados adequados. Após a definição dos valores de LD e LQ, a precisão do método foi avaliada.

#### 4.4.3. PRECISÃO

A precisão do método proposto foi avaliada por meio de estimativas de repetitividade (Rep) e de precisão intermediária (PI) considerando os desvios padrões relativos (% DPR), além da avaliação do valor de Horrat, para cada metal estudado. Os resultados são apresentados na tabela 14.

**TABELA 14.** RESULTADOS DO ESTUDO DE PRECISÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO de Cu, Fe, Mn e Zn EM FARINHAS E SEMENTES DE CHIA POR FAAS.

Metal	Rep	PI	Valor de Horrat
	DPR (%)	DPR (%)	
Cu	5,3	8	0,8
Fe	3,3	6,7	0,8
Mn	4,9	4,9	0,5
Zn	4,7	7,6	0,9

Conforme a Tabela 14, para as estimativas de repetitividade, os valores de DPR (%) foram considerados apropriados para todos os elementos estudados, pois se apresentaram entre 3,3 e 5,3%, os quais são inferiores aos recomendados pela AOAC na faixa das concentrações estudadas (< 11%) (INMETRO, 2018). Para as estimativas de precisão intermediária (PI), os valores de DPR também foram adequados, estando abaixo de 8,0% para todos os metais avaliados. Para a avaliação da adequabilidade das estimativas de precisão intermediária, foram calculados os valores Horrat, os quais variaram entre 0,5 a 0,9 e foram inferiores ao limite recomendado de 1,3 (AOAC, 2012). Desta forma, pode-se dizer que o método de extração assistida por ultrassom apresenta precisão adequada para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em farinhas e sementes de chia por F AAS.

Após a avaliação da precisão, a exatidão do método também foi verificada, para assim, considerar o método validado.

#### 4.4.4. EXATIDÃO

A exatidão do método proposto foi avaliada por meio da comparação das concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn obtidas para as amostras analisadas pela extração assistida por ultrassom (EAU) em relação ao método de referência adotado (digestão por via seca - VS). Os resultados de concentração de cada metal extraído da chia, através dos procedimentos de preparo de amostra comparados são apresentados na Tabela 15.



**TABELA 15.** CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE Cu, Fe, Mn E Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) EM AMOSTRAS DE FARINHAS E SEMENTES DE CHIA OBTIDAS PELOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU) E PELA DIGESTÃO POR VIA SECA (VS) E DETERMINAÇÃO POR F AAS.

Amostra	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Mn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	EAU	VS	EAU	VS	EAU	VS	EAU	VS
SC1	17 $\pm$ 2	15,2 $\pm$ 1,5	50,8 $\pm$ 0,4	53,7 $\pm$ 2,6	32,8 $\pm$ 0,3	32,6 $\pm$ 1,6	46 $\pm$ 2	41,2 $\pm$ 0,4
SC2	21,2 $\pm$ 0,5	22 $\pm$ 2	52,9 $\pm$ 2,5	52,3 $\pm$ 1,3	85,1 $\pm$ 1,3	94,3 $\pm$ 5,3	64 $\pm$ 4	53,0 $\pm$ 0,7
FC1	21 $\pm$ 1	19,5 $\pm$ 0,6	48,7 $\pm$ 1,5	61,4 $\pm$ 2,6	53,4 $\pm$ 5,5	54 $\pm$ 1	55,1 $\pm$ 1,5	53 $\pm$ 1
FC2	15,5 $\pm$ 0,4	15,2 $\pm$ 1,6	47,5 $\pm$ 0,9	53 $\pm$ 3	30,0 $\pm$ 0,9	25,6 $\pm$ 0,6	69 $\pm$ 5	50,2 $\pm$ 1,2

Aos resultados de concentração dos metais apresentados na Tabela 15, foi aplicado um *teste-t* pareado ao nível de 95% de confiança. Na Tabela 16 são apresentados os dados obtidos no estudo de exatidão do método nas diferentes amostras de farinhas e sementes de chia.

**TABELA 16.** RESULTADOS DO ESTUDO DE EXATIDÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn E Zn EM FARINHAS E SEMENTES DE CHIA POR F AAS.

Metal	<i>Teste-t</i> pareado	
	$t_{\text{calculado}}$	$p\text{-valor}$
Cu	0,69	0,522
Fe	2,17	0,083
Mn	1,00	0,365
Zn	3,41	0,019

$t_{\text{crítico}} (0,025;5) = 2,57$

Conforme a Tabela 16, os resultados do *teste-t* pareado variaram de 0,69 (Cu) a 3,41 (Zn), sendo que apenas para Zn o valor de  $p < 0,05$ . Pode-se sugerir que não existem diferenças significativas entre as concentrações de Cu, Fe e Mn obtidas pelos dois métodos de preparo de amostra comparados (extração assistida por ultrassom e digestão por via seca) no nível de 95% de confiança, pois para esses elementos os valores de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$  e os valores de  $p > 0,05$ . Com isso pode-se afirmar que o método proposto (extração assistida por ultrassom) apresenta, além da precisão, exatidão adequada. Por outro lado, o resultado do *teste-t* pareado, para a comparação dos métodos de preparo de amostra na determinação de Zn sugere que existem diferenças significativas entre a extração assistida por ultrassom e a digestão por via seca, pois o valor de  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$  e o valor de  $p < 0,05$ . Isso pode estar associado a perdas de Zn no procedimento de digestão por via seca que faz uso de maior manipulação da amostra, extração incompleta do elemento além de longos tempos de aquecimento em altas temperaturas

(NOGUEIRA, 2003). No entanto, essa pequena diferença observada, não compromete a eficiência de extração do Zn empregando a extração assistida por ultrassom.

A partir do estudo de validação, pode-se sugerir que a extração assistida por ultrassom, é um método de preparo de amostra que apresenta exatidão, precisão, linearidade, e limites de detecção e de quantificação adequados para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn. Desta forma, o método pode ser considerado validado para a aplicação em amostras de farinhas e de sementes de chia e determinação por F AAS.

#### 4.5. APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM NA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM CHIA POR F AAS

Após a otimização e a validação da metodologia para a determinação rápida de Cu, Fe, Mn e Zn em farinhas e sementes de chia por F AAS realizou-se a aplicação do método analítico em amostras comerciais, de diferentes procedências, produzidas no Brasil (Tabela 1). Na Tabela 17 são apresentados os valores de concentração para os metais avaliados nas 10 amostras de farinhas e de sementes de chia analisadas, bem como a concentração média de cada metal.

**TABELA 17.** CONCENTRAÇÕES DE Cu, Fe, Mn E Zn ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE FARINHAS E SEMENTES DE CHIA DE DIFERENTES LOCALIDADES DO BRASIL.

ID	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Mn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
FC*1	20,8 $\pm$ 1,2	48,7 $\pm$ 1,5	53,4 $\pm$ 5,5	55,1 $\pm$ 1,5
FC*2	15,5 $\pm$ 0,4	47,5 $\pm$ 0,9	30,1 $\pm$ 0,9	68,5 $\pm$ 4,8
FC*3	21,4 $\pm$ 0,9	57,0 $\pm$ 5,6	70,7 $\pm$ 1,9	61,8 $\pm$ 1,6
FC*4	16,0 $\pm$ 0,6	45 $\pm$ 4	69,7 $\pm$ 2,1	41,2 $\pm$ 2,6
FC*5	23 $\pm$ 1	60 $\pm$ 6	77 $\pm$ 4	62,1 $\pm$ 2,7
SC**1	17 $\pm$ 2	48,9 $\pm$ 3,7	34 $\pm$ 3	46 $\pm$ 2
SC**2	21,2 $\pm$ 0,5	52,9 $\pm$ 2,5	85 $\pm$ 1	64 $\pm$ 4
SC**3	16 $\pm$ 2	54,3 $\pm$ 5,3	49,1 $\pm$ 4,4	48,7 $\pm$ 6,5
SC**4	21,5 $\pm$ 1,7	52,7 $\pm$ 3,1	58,0 $\pm$ 2,7	54,6 $\pm$ 2,4
SC**5	19,6 $\pm$ 1,1	55 $\pm$ 3	55 $\pm$ 3	59 $\pm$ 8
Média	20 $\pm$ 1	53 $\pm$ 3	57 $\pm$ 3	57 $\pm$ 3

FC\*= farinhas de chia; SC\*\*= sementes de chia

Com relação à Tabela 17, pode-se verificar que as concentrações médias dos elementos na chia, seguiram a ordem de Mn > Zn > Fe > Cu, sendo que os valores de concentração mais altos foram encontrados para o Mn. Para este metal, as concentrações variaram entre 30,1  $\pm$  0,9 a 77  $\pm$  4 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), considerando as farinhas, e de 34  $\pm$  3 a 85  $\pm$  1 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para as sementes de chia. O Mn é um elemento importante no organismo humano, pois atua como um antioxidante

e está presente na formação de ossos, de cartilagens e cicatrização de feridas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et al., 2014). De acordo com estudos realizados para chia, podem ser encontradas concentrações de Mn em teores médios variando de 26,1 a 140  $\mu\text{g g}^{-1}$  ((BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018)). Os resultados determinados para a concentração de Mn neste estudo foram similares aos descritos na literatura.

Para Zn, não foram observadas grandes diferenças entre as concentrações encontradas para farinhas e para sementes de chia, sendo que, de forma geral, as mesmas variaram de  $46 \pm 2$  a  $68,5 \pm 4,8 \mu\text{g g}^{-1}$ . O Zn é conhecido por atuar como um fator de ativação de várias enzimas, como um estabilizador da estrutura do DNA, RNA e influencia o metabolismo hormonal no organismo humano (SENA e PEDROSA, 2005). De acordo com a literatura, as concentrações médias, do metal na chia, situam-se no intervalo de 32,6 a 75  $\mu\text{g g}^{-1}$  (BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018), intervalo que é similar as concentrações observadas neste estudo.

Para Fe os valores variaram entre  $45 \pm 4$  a  $60 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$  para as farinhas e de  $48,9 \pm 3,7$  a  $55 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$  para as sementes de chia. A principal função do Fe em sistemas biológicos está relacionada ao transporte de oxigênio pelo sangue como constituinte da hemoglobina (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008; GUPTA et al., 2014). De acordo com a literatura, as concentrações médias de Fe na chia situam-se no intervalo de 44,6 a 243,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018). Neste estudo, as concentrações encontradas foram mais baixas quando comparadas as reportadas por Bolaños et al. (2015) mas foram similares as concentrações encontradas por outros pesquisadores (BRITO et al., 2017; LLORENT-MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018). Estas diferenças podem ser explicadas por características geográficas e climáticas dos locais de produção da chia.

As concentrações mais baixas encontradas na chia foram para o Cu, as quais variaram entre  $15,5 \pm 0,4$  a  $23 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$  para as farinhas e  $16 \pm 2$  a  $21,5 \pm 1,7 \mu\text{g g}^{-1}$  para as sementes de chia. O cobre está presente no organismo em enzimas envolvidas na respiração celular, na defesa contra radicais livres, na função de neurotransmissão e na síntese de tecido conjuntivo (ILSI BRASIL, 2017). De acordo com a literatura, as concentrações médias de Cu em chia situaram-se entre 3,65 a 22,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  (BOLAÑOS et al., 2015; BRITO et al., 2017; LLORENT-

MARTINÉZ et al., 2013; RUBIO et al., 2018), as quais foram similares as observadas neste estudo.

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2006), os valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) para Mn, Zn, Fe e Cu são de 2,3; 7,0; 14 e 0,9 mg dia<sup>-1</sup>, respectivamente, considerando adultos.

Segundo Veggi et al. (2018), nos EUA, a chia é tida como fonte primária de alimento, sendo que a recomendação de ingestão não deve exceder a quantidade de 48 g dia<sup>-1</sup>. A Comissão Européia também aprovou o uso da chia para panificação e outras finalidades (VEGGI et al., 2018; ALI et al., 2012). Já no Brasil a chia é classificada como um produto que não é conhecido, comercializado ou consumido de forma significativa (BRASIL, 2013).

Alguns estudos relatam que o consumo diário de 25 g dia<sup>-1</sup> de sementes de chia, por humanos, considerando um intervalo de sete semanas, apresentou benefícios à saúde (COELHO e SALLAS-MELLADO, 2014).

Considerando um consumo diário de 25 g de chia, é possível estimar a quantidade dos metais que, teoricamente, seria ingerida pelos humanos. Os dados são mostrados na Tabela 18, e correspondem as concentrações médias determinadas no presente estudo (Tabela 17). Também estão apresentados os valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR).

**TABELA 18.** VALORES DE INGESTÃO DIÁRIA DE Cu, Fe, Mn E Zn, CONSIDERANDO UM CONSUMO DE 25 g DE CHIA, EM RELAÇÃO AOS VALORES DE IDR.

<b>Metal</b>	<b>IDR*</b>	<b>25 g dia<sup>-1</sup></b>
Cu	900 µg	505 µg
Fe	14,0 mg	1,32 mg
Mn	2,30 mg	1,41 mg
Zn	7,0 mg	1,43 mg

\*(Fonte: BRASIL, 2006)

Com relação à Tabela 18, é possível observar que as estimativas de ingestão de metais, através do consumo diário da chia, se encontram dentro do recomendado, variando de 505 µg (Cu) a 1,43 mg (Zn), quando comparados aos valores permitidos pela Anvisa (BRASIL, 2005).

Porém deve-se ressaltar que essa é apenas uma estimativa teórica. Dados mais exatos com relação à ingestão diária recomendada vão depender da forma como os metais são absorvidos pelo organismo humano.

## 5. CONCLUSÃO

O planejamento de misturas utilizado foi a principal ferramenta para a otimização da composição do solvente extrator enquanto estudos univariados permitiram a otimização de outras variáveis como massa de amostra, tempo de sonicação e tipo de filtração.

Foi possível obter bons resultados de extração dos metais de interesse com a utilização de uma mistura de 3,3 mL de ácido nítrico e 1,7 mL de peróxido de hidrogênio como solução extratora, um tempo de sonicação de 15 minutos em banho de ultrassom, uma massa de 0,2 g, uma frequência de sonicação de 37 kHz e uma amplitude de 100 W. É notória também a eficiência da redução significativa do tempo de filtração com o uso do papel de filtro pregueado em relação ao papel de filtro liso.

A partir dos resultados do estudo de validação do método proposto, pode-se sugerir que a extração assistida por ultrassom, é um método de preparo de amostra que apresenta exatidão, precisão, linearidade, e limites de detecção e de quantificação adequados para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de farinhas e de sementes de chia. Desta forma o método pode ser considerado validado para a aplicação em amostras de farinhas e sementes de chia e determinação por F AAS.

A aplicação da metodologia proposta em amostras de chia permitiu verificar que as faixas de concentrações dos metais estudados entre as farinhas e sementes são proporcionais, e quando comparados os resultados obtidos neste estudo com os de estudos já realizados por outros autores os mesmos apresentam concentrações similares para os metais de interesse. E também é possível verificar que para o consumo de 25 g dia<sup>-1</sup> de chia, os resultados de concentração de metais estão dentro do limite recomendado de ingestão em uma dieta convencional.

Desta forma, pode-se sugerir a extração assistida por ultrassom é precisa e exata e pode ser utilizada em laboratórios de controle de qualidade e de fiscalização, pois apresentou resultados precisos quanto à concentração dos metais de interesse, e é de extrema importância já que ainda são poucos os estudos relacionados a composição mineral da chia. Dessa forma, é possível comprovar a viabilidade da utilização da técnica de extração assistida por ultrassom para extração de metais em sementes e farinhas de chia de forma simples, rápida, ambientalmente amigável e econômica destacando o menor tempo de análise e menor uso de reagentes tóxicos, o que resulta em redução de custos da EAU quando comparada as técnicas convencionais de preparo de amostra.

## 6. REFERÊNCIAS

ALEIXO, P. C.; NOBREGA, J. A. Determinação Direta de Selênio em Água de Coco e em Leite de Coco Utilizando Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite. **Quím. Nova**, Vol 23, No. 3,310-312, 2000.

ALI, N.M.; YEAP, S.K.; HO, W.Y.; BEH, B.K.; TAN, S.W.; TAN, S.G. The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

AMANCIO, OLGA MARIA SILVERIO; Cobre. **Funções Plenamente Reconhecidas De nutrientes** ; v. 19, p. 1- 28, 2017.

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.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

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

AREAL, R. **Nutricion para el êxito del deportista**. Barcelona: Reverte, S.A. 1988.p.581582.  
AYERZA, R.; COATES, W. Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. **Tropical Science**, v.44, n.3, p.131-135,2004.

BARBOZA, Fernanda Malaquias et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.747-749, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª edição. Campinas, SP: Editora da Unicamp. 401 p, 2002.

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

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

BRASIL. ANVISA. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Resolução RDC nº 182, de 03 de outubro de 2006

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

BRASIL. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, Revisão 04, Julho de 2011.

BENDICHO, C.; LAVILLA, I.. Ultrasound-Assisted Metal Extractions. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, [s.l.], p.1-5, 2013. Elsevier.

BENEVIDES, Clícia Maria de Jesus et al. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.67-79, 10 fev. 2015. Universidade Estadual de Campinas.

BERNARDO, Cristiany Oliveira; ASCHERI, José Luis Ramírez; CARVALHO, Carlos Wanderlei Piler de. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.739-746, abr. 2016.

BOLAÑOS, MARCHEVSKY CAMIÑADE, Elemental analysis of amaranth, chia, sesame, linen, and quinoa seeds by: ICP-OES: Assessment OF CLASSIFICATION BY chemometrics. **Food anal. Methods**. p.1-8, 2015.

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

BRITO, N.M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

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

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.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRIGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 100–104, 2012.

CASSIANO, Neila Maria et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.1021-1030, 2009.

CAVALHEIRO, C. V. **Extração de Compostos Fenólicos Assistida por Ultrassom e Determinação de Ácidos Graxos e Minerais em Folhas de Olea Europaea L.** 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.



CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K.. KINETICS OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF WEDELACTONE FROM *Eclipta alba*. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.1003-1010, dez. 2016.

CHEMAT, Farid; ZILL-E-HUMA; KHAN, Muhammed Kamran. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.813-835, jul. 2011.

CHEMAT, Farid et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 34, p.540-560, jan. 2017.

COELHO, M.S.; SALAS-MELLADO, M.M. Review: Chemical composition, functional 63 properties and technology applications of chia (*Salvia hispanica* L) seed in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 259-268, 2012.

COSTA, Vinícius et al. Use of Mixture Design with Minimal Restrictions to Optimize an Extraction Procedure Employing Diluted Acids Assisted by Ultrasound and Microwave for Nutrient Element Determination in Vegetal Samples. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], p.1189-1198, 2017.

DOQ-CGCRE 008, INMETRO. "Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos." *Rio de Janeiro. Brasil* (2018), Revisão 07.

DING, Yi et al. Nutritional composition in the chia seed and its processing properties on restructured ham-like products. **Journal Of Food And Drug Analysis**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.124-134, jan. 2018. Elsevier BV.

DYNER, Luis et al. Contenido de calcio, fibra dietaria y fitatos en diversas harinas de cereales, pseudocereales y otros. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 50, p.435-443, 2016.

EURACHEM GUIDE: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, B. Magnusson and U. Örnemark (eds.), 2nd ed. 2014.

FALCO, Bruna de et al. Metabolomic analysis by UAE-GC MS and antioxidant activity of *Salvia hispanica* (L.) seeds grown under different irrigation regimes. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 112, p.584-592, fev. 2018.

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 Ultrasound- assisted extraction from chocolate powder samples for the. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.17, n.3, p. 236–242, 2014.

FERREIRA, Sergio L.c. et al. Atomic absorption spectrometry – A multi element technique. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 100, p.1-6, mar. 2018.

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.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects Of Medicine**, v. 26, n. 4-5, p.235-244, ago. 2005.

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. **Quím. Nova**, v. 38, n. 7, p. 1158-1164, 2015.

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

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê: os minerais na alimentação** . n.4, julho 2008.

Disponível em : <http://www.revista-fi.com/materias/52.pdf>.

GALVÃO, F. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica Baseada no Processo de Foto-Oxidação UV para a Determinação de Fe, Mn e Zn em Sucos de Fruta por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS)**. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do CentroOeste, 2017.

GARCÍA-SALCEDO, Ángela Janet et al. Pasting, viscoelastic, and physicochemical properties of chia ( *Salvia hispanica* L . ) flour and mucilage. **Food Structure**, [s.l.], v. 16, p.59-66, abr. 2018.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZGUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, 12, 8813-8826, 2010.

GARRIDO, María Liva et al . Procedimiento analítico para la determinación de metales pesados en zanahoria y espinaca cultivadas en organopónicos urbanos. **Rev Cie Téc Agr**, San José de las Lajas , v. 22, n. 1, p. 20-26, marzo 2013 .

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.227-238, mar. 2007.

GUPTA U. C., GUPTA, S. C. Sources and. Deficiency Diseases off Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review. **Pedosphere**, V.24, p13-38,2014.

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

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

JESUS, Bianca Raquel Teixeira de. **MICRONUTRIENTES NA PREVENÇÃO DA DOENÇA NO IDOSO**. 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

KASTENMAYER, P. Analisis de Minerales y Elementos Traza em Alimentos. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s22.htm>.

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.

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

KRUG, F. J. Métodos de preparo de amostras: **Métodos sobre preparo de amostra orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1 ed. F. J. Krug: Piracicaba, 2010. 340p.

LENARDÃO, E. J. et al. Green chemistry - os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino. **Quím. Nova**. vol.26 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2003.

LIN, Kuei-ying; DANIEL, James R.; WHISTLER, Roy L.. Structure of chia seed polysaccharide exudate. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.13-18, jan. 1994.

LUZ, L. P. **Estudo do Ultrassom como Técnica de Extração de Carvões e Caracterização dos Hidrocarbonetos Poliaromáticos**. 1998. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MACEDO, Érika Michelle C. de et al . Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. **Rev. paul. pediatr.**, São Paulo , v. 28, n. 3, p. 329-336, Sept. 2010.

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, 201.

MARAN, J. P. S. MANIKANDAN, C.V. NIVETHA, R. DINESH. **Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design** Arab. J. Chem., 10 (2017), pp. S1145-S1157.

MENDIVELSO, E. J. D. Otimização e Validação da Extração Assistida por Ultrassom para a Determinação de Íons Metálicos em Chia (*Salvia hispanica* L.) 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do CentroOeste, 2016.

MIGLIAVACCA, R. A.; VASCONCELOS, A. L. S.; SANTOS, C. L.; BAPTISTELLA, JOÃO L. C. Uso da cultura da chia como opção de rotação no sistema de plantio direto. In: ENCONTRO NACIONAL DE PLANTIO DIRETO NA PALHA, 14, 2014, Bonito. Anais. Brasília: Embrapa, 118p.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Functional Foods and Nutraceuticals: Definition, Legislation and Health Benefits. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

MORAES, P. M.; LOUREIRO, V.R.; PADILHA, P. M.; NEVES, R, C. F.; SALEH, M. A. D.; DOS SANTOS.; F. A.; SILVA, F.A. Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultrassom e espectrofotometria no visível. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 923-927, 2009.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V. 19, n. 3, 1999.

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.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D.C.; ANDERSON-COOK, C.M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. – 4a ed. New York: Wiley, 2016.

NASCENTES, Clésia C. et al. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.57-63, 2001.

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.

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

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.

NOVAES, C. G.; Yamaki, R. T.; Paula, V. F.; Nascimento Jr.; B. B.; Barreto, J. A.; Valasques, G. S.; Bezerra, M. A.; **Rev. Virtual Quim.** 2017, 9, 1184.

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.

OLIVOS-LUGO, B. L.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. Á.; 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**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 89-96, 2010.

ORONA-TAMAYO, D.; VALVERDE, M.e.; PAREDES-LÓPEZ, O.. Chia—The New Golden Seed for the 21st Century. **Sustainable Protein Sources**, [s.l.], p.265-281, 2017.

ORONA-TAMAYO, Domancar et al. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.236-242, nov. 2015.

PEIRETTI, P. G.; GAI, F. Fatty Acid and Nutritive Quality of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds and Plant During Growth. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 148, n. 2-4, p. 267-275, 2009.

PEREZ, M. A. F. Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante? Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens, v. 22, n. 3, p. 1-9, 2010.

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

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.

PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted digestion: a useful alternative in sample preparation methods. **J. Biochem. Biophys**, 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.

RIBANI; BOTTOLI C.B.G.; COLLINS C.H.; JARDIM I.C.S.F.; MELO L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**, 27: 771-780, 2004.

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.164-171, 2008.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*. v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

RUBIO, Carmen et al. Metals in food products with rising consumption (brewer's yeast, wheat bran, oat bran, sesame seeds, flaxseeds, chia seed). A nutritional and toxicological evaluation. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 48, p.558-565, set. 2018.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R. Análise de Metais em Amostras Comerciais de Erva-mate do Sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 2, p. 259-265, 2010.

SANDBERG AS (2002) In vitro and in vivo degradation of phytate. In *Food Phytates*, pp. 139 – 155 [NR Reddy and Sk Sathe, editors]. Boca Raton, Florida: CRC Pres.

SANTOS, W. A. **Procedimento simples de diluição de biodiesel em álcool para determinação de Mg por espectrometria de absorção atômica com chama**. São Luis, 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Federal do Maranhão, 2016.

SENA, Karine Cavalcanti Maurício de; PEDROSA, Lucia de Fátima Campos. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.251-259, abr. 2005.

SHIRSATH, S.R. et al. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - a review of current status. **Chemical Engineering and Processing**, v.53, p.10-23, 2012.



SILVA, W.J.M. Ácido fólico: **Validação do método espectrofotométrico**. 2012. 68f. Dissertação (Pós-graduação em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, 2012.

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

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R., **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª Edição – São Paulo: Cenage Learning, 2013.

SOUSA, R. A de; CAMPOSA, N. S.; ORLANDO, R. **Apostila de Apoio em química analítica avançada**- Instituto de Ciências Exatas- Departamento de Química, UFJF; Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química, UFMG. Juiz de Fora, junho de 2015.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 297f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

TAO, Y.; SUN, D. Enhancement of food processes by ultrasound: a review. **Food Science and Nutrition**, v.55, n.4, p.570-594, 2015.

TEIXEIRA, T. A. P. **UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS NO DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE DEFENSIVO AGRÍCOLA**. 2012. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena - Eel/usp, Lorena- Sp, 2012.

THOMPSON M, ELLISON SLR, WOOD R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem**. v. 74 (5), pp.: 835-855, 2002.

TORRES, E. A. F. S.; CAMPOS, N. C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M.L.; PHILIPPI, S. T.; MINAZZI-RODRIGUES, R. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol.20, no.2, p.145-150. Campinas, Ago. 2000.

TOSCO, G. Os Benefícios da “Chia” em Humanos e Animais. **Atualidades Ornitológicas**, n. 119, p. 7, 2004.

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.

VASCONCELOS, Arthur A. et al. Determination of Cu, Fe, Mn e Zn Using FAAS in Cassava (Manihot esculenta Crantz) Roots from Eastern Amazon. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.2316-2331, 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

VEGGI, Natalie et al. Quality of high-protein diet bar plus chia (Salvia hispanica L.) grain evaluated sensorially by untrained tasters. **Food Science And Technology**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.306-312, dez. 2018.

VÉLEZ-ERAZO, Eliana Marcela; CONSOLI, Larissa; HUBINGER, Miriam Dupas. Mono and double-layer emulsions of chia oil produced with ultrasound mediation. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 112, p.108-118, nov. 2018.

VIDAL, A.M. et al., A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Cadernos de Graduação**. v. 1, n.15, p. 43-52, out. Aracaju, 2012.

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.

VINATORU, Mircea. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.303-313, jul. 2001.

VIZZOTTO, Márcia et al . Composição mineral em genótipos de batata-doce de polpas coloridas e adequação de consumo para grupos de risco. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas , v. 21, e2016175, 2018 .

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

WOJCIESZEK, Justyna; POPOWSKI, Dominik; RUZIK, Lena. Ionic liquids as a key medium for efficient extraction of copper complexes from chia seeds (*Salvia hispanica* L.).

ZU, Ge et al. Ultrasound-Assisted Extraction of Carnosic Acid and Rosmarinic Acid Using Ionic Liquid Solution from *Rosmarinus officinalis*. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 9, p.11027-11043, 5 set. 2012.