

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE DO PARANÁ – UNICENTRO

VANDRESSA ALVES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM APLICADA NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM
MELADO DE CANA**

GUARAPUAVA

2019

VANDRESSA ALVES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM APLICADA NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM
MELADO DE CANA**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, como requisito à obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Lurdes Felsner
Coorientador: Dr.^a Jucimara Kulek de Andrade

GUARAPUAVA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a prof.^a. Dr.^a. Maria Lurdes Felsner pela orientação, dedicação e ensinamentos, principalmente pelos incentivos e motivações em todo o processo de desenvolvimento desse trabalho.

À Jucimara Kulek de Andrade, por toda a ajuda em todas as etapas desse trabalho, pela disponibilidade sempre que necessário e por me apoiar nos momentos difíceis.

À minha família pelo apoio e pela paciência, principalmente a minha irmã Vanessa Alves por sempre estar ao meu lado e me incentivar a ser persistente em meus objetivos.

À minha amiga Francielly Ap^a. Bahia, por toda a amizade, ajuda e apoio durante todo o período necessário para a finalização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório LabGati, pelo companheirismo, pela ajuda e pelos momentos de descontração no laboratório.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Unicentro.

Enfim, a todos que contribuíram e me apoiaram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

O melado, produzido a partir do processo de evaporação do caldo de cana, é um subproduto da cana-de-açúcar. É também considerado um alimento com elevado teor de açúcares e minerais. Em vista disso, é importante conhecer a composição mineral deste alimento, considerando que existem poucos estudos na literatura relacionados a esta matriz. Assim, nesse trabalho foram desenvolvidas metodologias baseadas na extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, Mn, Ca, Mg e P em amostras de melado de cana por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e molecular no UV-VIS. Um planejamento de misturas do tipo simplex centroide foi aplicado com o intuito de se determinar as melhores proporções do solvente extrator (ácido nítrico, ácido clorídrico e água) por meio de modelos estatísticos e, assim, obter taxas de extração próximas a 100%, para estes elementos. A condição ótima de extração para Fe, Mn, Ca, Mg e P foi obtida com 0,5 g de amostra, 100 W de potência, 37 kHz de frequência e 10 minutos de sonicação a 25 °C. Em relação ao solvente extrator, a condição ótima para as extrações de Fe e Mn foi obtida com 5,00 mL de H₂O; a melhor proporção dos solventes extratores para as extrações de Ca e Mg, foi de 75:25 % (v/v) de HNO₃:H₂O e para o P a condição ótima foi obtida com as proporções de 34:40:26 % (v/v) de HNO₃:HCl:H₂O como solventes extratores, respectivamente. O comportamento distinto em relação ao solvente extrator, pode ser atribuído às diferentes formas que os metais estão ligados a matriz. Dessa forma, o planejamento de misturas possibilitou uma otimização rápida e eficiente da composição ótima do solvente extrator usado neste procedimento. Para analisar a confiabilidade do método de extração assistida por ultrassom para a determinação de metais foi realizado um estudo de validação, em que se avaliaram algumas figuras de mérito como, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão, por meio de diferentes testes estatísticos. Curvas de padrão externo, em meio aquoso, foram aplicadas para todos os elementos. Estas apresentaram uma boa linearidade, com valores de $F_{regressão} \gg F_{crítico}$, e de $p < 0,05$, sem falta de ajuste para o modelo linear e coeficientes de determinação (R^2) entre 92,2 a 99,8%. Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram relativamente baixos, sendo estes de 0,266 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Fe, 0,284 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Mn, 0,037 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Mg, 0,282 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Ca e 0,296 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o P; com LQ de 0,805 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Fe, 0,861 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Mn, 0,114 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Mg, 0,854 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Ca e 0,898 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o P, respectivamente. A precisão dos métodos desenvolvidos foi verificada por estimativas de repetitividade e de precisão intermediária, expressas pelos desvios padrão relativos (DPR %) e pelo valor Horrat. Os valores de DPR (%) foram considerados apropriados, sendo inferiores ao recomendado pela AOAC (< 11%), com valores de Horrat inferiores a 1,3. Para avaliar a exatidão, foram comparados os métodos de extração assistida por ultrassom com o de digestão assistida por micro-ondas (método de referência), aplicando-se um teste-*t* pareado. Este sugeriu que não há diferenças estatisticamente significativas entre os métodos comparados para a determinação de Fe, Mn, Mg, Ca e P em um intervalo de confiança de 95%, com valores de $t_{calculado} < t_{crítico}$ e de $p > 0,05$. Isso indica que os métodos de extração assistida por ultrassom apresentam resultados exatos e precisos para a quantificação desses elementos em amostras de melado de cana. Além disso, esse método de preparo de amostra é alternativo aos métodos convencionais, pois proporciona maior rapidez, menor geração de resíduos a partir do baixo consumo de solventes, menor impacto ao meio ambiente, menores riscos ao analista, além de ser de baixo custo. Dessa forma, as metodologias desenvolvidas nesse estudo se tornam atrativas para a implantação em laboratórios de análises alimentares, permitindo a realização do monitoramento dos níveis desses minerais em matrizes ricas em açúcares, como é o caso do melado de cana, garantindo, assim, um melhor controle de qualidade do produto. Por meio da aplicação da análise de componentes principais (ACP), foi possível verificar que há uma tendência de agrupamento, em relação aos teores dos elementos analisados, nas amostras de melado de cana, de acordo com a procedência do produto, mostrando que fatores como a matéria-prima, o clima, o solo e o processamento adotado pelo fabricante de determinada região, influenciam nos teores finais dos elementos na matriz.

Palavras-chave: Melado de cana, Extração assistida por ultrassom, Metais, Planejamento de misturas, Espectrometria de absorção atômica, Espectrofotometria molecular no UV-VIS, Validação de métodos.

ABSTRACT

Cane syrup, made from process of evaporation of sugarcane juice, is a byproduct of sugarcane. It is also considered a food with elevated sugars and minerals contents. Therefore, it is important to know the mineral composition of this food, considering there are few studies in the literature about of this product. Thus, the purpose of this study was developed methodologies based in the ultrasound assisted extraction for determination of Fe, Mn, Ca, Mg and P in cane syrup samples by Atomic Absorption Spectrometry in Flame (F AAS) and Molecular Spectrometry in the UV-VIS region. A simplex centroid mixture design was applied in order to determine the optimal proportion of extractor solvent (nitric acid, hydrochloric acid and water) through of statistics models and then get extraction rates close to 100% for these elements. Optimal extraction condition for Fe, Mn, Ca, Mg and P was obtained with sample mass of 0.5 g, power of 100 W, frequency of 37 kHz and 10 minutes of sonication at temperature of 25 °C. For Fe and Mn extractions, the optimal condition was obtained with 5.00 mL H₂O; the best proportion evaluated for Ca and Mg extractions was the proportion of 75:25 % (v/v) of HNO₃:H₂O as extractor solvents and for P extraction, the optimum condition was obtained with the proportion of 34:40:26 % (v/v) of HNO₃:HCl:H₂O as extractor solvents, respectively. Distinct compartment of the extractor solvents was attributed the different way that metals are bound in the cane syrup. Thus, mixture design allowed a quick and efficient optimization of composition extractor solvents used in this procedure. Reliability of ultrasound assisted extraction methods to the determination of metal was verify by a validation study in which were evaluated parameters such as linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision and accuracy, applying different statistic tests. Analytical curves obtained by external standardization were employed for all elements. They showed good linearity, with values of $F_{regression} \gg F_{critical}$, and values of $p < 0.05$, without lack of fit for the linear model and determination coefficients (R^2) between 92.2 and 99.8 %. LOD and LOQ values were relatively low, with LOD values of 0.266, 0.284, 0.037, 0.282 and 0.296 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Fe, Mn, Mg, Ca and P; with LOQ values of 0.805, 0.861, 0.114, 0.854 and 0.898 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Fe, Mn, Mg, Ca and P, respectively. Precision was verified by repeatability and intermediate precision estimates, using the relative standard deviations (RSD %) and Horrat values. RSD % values were considered appropriate, lower ones than those recommended by AOAC (< 11%), with Horrat values < 1.3. Accuracy was evaluated by comparison between ultrasound assisted extraction methods and microwave digestion method (reference method) applying a *paired t-test*. It was not observed significant statistical differences between the compared methods to determination Fe, Mn, Mg, Ca and P at 95% confidence level, with values of $t_{calculated} < t_{critical}$ and value of $p > 0.05$. These facts indicated that ultrasound assisted extraction methods show exact and precise results in order to quantification these elements in cane syrup samples. In addition, the ultrasound assisted extraction is an alternative sample preparation method when compared with conventional methods, because it was faster, produce lesser residues generation through lesser solvents consume, lower environment impact, lower risks to analyst, furthermore being of low cost. Thus, methodologies developed in this study becomes attractive to the implantation in food analysis laboratories, allowing the monitoring of minerals levels in sugar rich foods, such as cane syrup, ensuring a better control quality of the product. Through the Principal Component Analysis (PCA), was possible to verify that there are a grouping trend in analyzes of the elements in the cane syrup samples, according with product origin, showing that factors such as raw material, climate, soil and processing adopted for manufacturer of the certain region, influence final metals contents in the product.

Keywords: Cane syrup, Ultrasound assisted extraction, Metals, Mixture design, Atomic absorption spectrometry flame, Molecular spectrometry in the UV-Vis, Validation methods.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	15
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 OBJETIVO GERAL	18
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1 MELADO DE CANA DE AÇÚCAR	27
2.2 IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS NO MELADO DE CANA	28
2.3 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS	30
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O PREPARO DE AMOSTRA	31
2.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU).....	33
2.6 APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO DE MISTURAS PARA A OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	35
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	39
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 3. METODOLOGIA	54
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	55
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	55
3.3 AMOSTRAGEM	56
3.4 DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	57
3.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU).....	58
3.6 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR POR UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS.....	58
3.7 DETERMINAÇÃO DE FE, MN, CA E MG POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS).....	61
3.8 DETERMINAÇÃO DE P POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO UV-VIS.....	61
3.9 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	62
3.9.1 Curvas Analíticas e Linearidade	63
3.9.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	64

3.9.3 Precisão.....	64
3.9.4 Exatidão.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
CAPÍTULO 4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	68
4.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	69
4.2 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR POR PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE.....	71
REFERÊNCIAS.....	74
CAPÍTULO 5. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA FE E MN EM MELADO DE CANA	76
5.1 EXTRAÇÃO DE FE E MN A PARTIR DE UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE	77
REFERÊNCIAS.....	87
CAPÍTULO 6. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA CA E MG EM MELADO DE CANA	89
6.1 EXTRAÇÃO DE CA E MG A PARTIR DE UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE	90
REFERÊNCIAS.....	99
CAPÍTULO 7. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA P EM MELADO DE CANA	100
7.1 AVALIAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE P EM MELADO DE CANA POR MEIO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	101
7.2 EXTRAÇÃO DE P A PARTIR DE UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE.....	110
REFERÊNCIAS.....	117
CAPÍTULO 8. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM NA DETERMINAÇÃO DE FE, MN, MG, CA E P EM MELADO DE CANA	119
8.1 CURVAS ANALÍTICAS E LINEARIDADE	120
8.2 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	124
8.3 PRECISÃO.....	126

8.4 EXATIDÃO.....	127
REFERÊNCIAS.....	130
CAPÍTULO 9. APLICAÇÃO DE UMA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA	131
9.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP).....	132
REFERÊNCIAS.....	142
CAPÍTULO 10. CONCLUSÕES	143
10.1 CONCLUSÕES	144
APÊNDICE. ESPECTROS DE UV-VIS OBTIDOS PARA O P REFERENTE ÀS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS	146

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - INFORMAÇÕES E CODIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MELADO DE CANA UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO.....	57
TABELA 2 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS PARA A DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR.	59
TABELA 3 - FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADAS NAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Ca, Mg E P.	63
TABELA 4 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR PARA A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE METAIS EM MELADO DE CANA.....	73
TABELA 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS LINEAR, QUADRÁTICO E CÚBICO ESPECIAL NO NÍVEL DE 95 % DE CONFIANÇA PARA Fe E Mn.	77
TABELA 6 - RESULTADOS PARA A AVALIAÇÃO DA FALTA DE AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA Fe E Mn.....	78
TABELA 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS LINEAR, QUADRÁTICO E CÚBICO ESPECIAL NO NÍVEL DE 95% DE CONFIANÇA PARA Mg E Ca... ..	90
TABELA 8 – AVALIAÇÃO DA FALTA DE AJUSTE DOS MODELOS QUADRÁTICOS AJUSTADOS PARA Mg E Ca.	91
TABELA 9 – DADOS DA APLICAÇÃO DE UMA REGRESSÃO LINEAR PARA O P EMPREGANDO AS CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO (PE), EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR E DE ADIÇÃO DE PADRÃO (AP) PARA AS CONDIÇÕES 2,3 E 6 DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS.	109
TABELA 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS LINEAR, QUADRÁTICO E CÚBICO ESPECIAL NO NÍVEL DE 95% DE CONFIANÇA PARA O P.	111
TABELA 11 - PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca e P EMPREGANDO AS CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO, DE ADIÇÃO DE PADRÃO E DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR.....	122
TABELA 12 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA LINEARIDADE DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P, NO NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%.	123
TABELA 13 - LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO PARA Fe, Mn, Mg, E Ca EMPREGANDO A TÉCNICA DE F AAS E DE P PELA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS.	125
TABELA 14 - RESULTADOS DO ESTUDO DA PRECISÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	126

TABELA 15 – CONCENTRAÇÕES MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA OBTIDOS PELA APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E DE DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.....	128
TABELA 16 - RESULTADOS DO TESTE-t PAREADO PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	129
TABELA 17 – CONCENTRAÇÕES MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA OBTIDOS NA APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.	133
TABELA 18 – ACP CORRELACIONADA COM AS CARGAS MARCADAS PARA CADA VARIÁVEL EM RELAÇÃO AOS TEORES MÉDIOS DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	136
TABELA 19 – MATRIZ DE CORRELAÇÃO ENTRE OS AUTOVALORES PARA Fe, Mn, Mg, Ca E P EM RELAÇÃO AOS TEORES MÉDIOS DE CADA ELEMENTO.	136

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ILUSTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX CENTROIDE APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR PARA A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE MINERAIS EM MELADO DE CANA.....	60
FIGURA 2 - TESTE DE EROÇÃO DO PAPEL ALUMÍNIO PARA IDENTIFICAÇÃO DA REGIÃO DE MAIOR CAVITAÇÃO NO BANHO DE ULTRASSOM. (a) PAPEL ALUMÍNIO ANTES DO TESTE, (b) APÓS 1 MINUTO, (c) APÓS 5 MINUTOS E (d) SUPORTE DE PAPELÃO COM OS TUBOS LOCALIZADOS NA REGIÃO DE MAIOR CAVITAÇÃO.....	69
FIGURA 3 – GRÁFICOS DE VALORES PREVISTOS VERSUS VALORES OBSERVADOS: (a) PARA O MODELO LINEAR E (b) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O Fe; (c) PARA O MODELO LINEAR E (d) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O Mn.....	81
FIGURA 4 – GRÁFICOS DE CONTORNO DE MISTURAS GERADOS PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX CENTRÓIDE CONSIDERANDO OS VALORES DE TAXAS DE EXTRAÇÃO PARA (a) Fe E (b) Mn EM MELADO DE CANA.....	82
FIGURA 5 – GRÁFICOS DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA (a) Fe E (b) Mn.....	84
FIGURA 6 – PERFIS PARA OS VALORES PREVISTOS PARA A DESEJABILIDADE INDIVIDUAL DA OTIMIZAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS VARIÁVEIS DE MISTURA PARA (a) Fe E (b) Mn.....	85
FIGURA 7 - GRÁFICO DE VALORES PREVISTOS VERSUS VALORES OBSERVADOS: (a) E (c) PARA O MODELO LINEAR E (b) E (d) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O Mg E PARA O Ca.....	93
FIGURA 8 - GRÁFICO DE CONTORNO DE MISTURAS GERADO PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO CONSIDERANDO OS VALORES DE EXTRAÇÃO PARA (a) Mg E (b) Ca EM MELADO DE CANA.....	94
FIGURA 9 – GRÁFICOS DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA (a) Mg E (b) Ca.....	96
FIGURA 10 - PERFIL DOS VALORES PREVISTOS PARA A DESEJABILIDADE INDIVIDUAL DA OTIMIZAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS VARIÁVEIS DE MISTURA PARA Mg e Ca.....	97
FIGURA 11 - TUBOS FALCON CONTENDO A AMOSTRA DE MELADO DE CANA E OS REAGENTES EXTRADORES (a) ANTES DA SONICAÇÃO E (b) APÓS O PROCESSO DE SONICAÇÃO REFERENTES A MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX CENTRÓIDE.....	102

FIGURA 12 – ETAPAS DE FORMAÇÃO DA REAÇÃO DE MAILLARD.....	103
FIGURA 13 – ESPECTROS DE UV-VIS PARA O P: O ESPECTRO (a) REFERE-SE À CONDIÇÃO DO PLANEJAMENTO USANDO HCl, O ESPECTRO (b) A UTILIZAÇÃO DE H ₂ O E O ESPECTRO (c) A MISTURA BINÁRIA DE HCl E H ₂ O, COMO SOLVENTES EXTRATORES.....	106
FIGURA 14 – CURVAS ANALÍTICAS PARA OS EXPERIMENTOS (a) 2, (b) 3 E (c) 6 DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS, EMPREGANDO A CALIBRAÇÃO POR PADRÃO EXTERNO EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR (●) E CALIBRAÇÃO POR ADIÇÃO DE PADRÃO (■).....	108
FIGURA 15 - GRÁFICOS DE VALORES PREVISTOS VERSUS VALORES OBSERVADOS: (a) PARA O MODELO LINEAR E (b) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O P.....	113
FIGURA 16 - GRÁFICO DE CONTORNO DE MISTURAS GERADO PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO CONSIDERANDO OS VALORES DE TAXAS DE EXTRAÇÃO PARA P EM MELADO DE CANA.	114
FIGURA 17 – GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA O P.....	115
FIGURA 18 - PERFIL DOS VALORES PREVISTOS PARA A DESEJABILIDADE INDIVIDUAL DA OTIMIZAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS VARIÁVEIS DE MISTURA PARA O P.....	116
FIGURA 19 - CURVAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE (a) Fe, (b) Mn, (c) Mg, (d) Ca E (e) P, EMPREGANDO CALIBRAÇÃO POR PADRÃO EXTERNO (●), CALIBRAÇÃO POR ADIÇÃO DE PADRÃO (■) E CALIBRAÇÃO POR PADRÃO EXTERNO EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR (◆).....	121
FIGURA 20 - GRÁFICO SCREE PLOT DOS PERCENTUAIS DAS VARIÂNCIAS OBTIDOS PELAS COMPONENTES PRINCIPAIS DOS TEORES DE MINERAIS NAS AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	135
FIGURA 21 - GRÁFICO DE PESOS DAS VARIÁVEIS OBTIDO PELA ANÁLISE DOS TEORES MÉDIOS DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	137
FIGURA 22 - GRÁFICO DE ESCORES DA CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DE Fe, Mn, Mg., Ca E P E OS TEORES MÉDIOS DESSES ELEMENTOS EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	138
FIGURA 23 – GRÁFICO DE ESCORES DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES MÉDIOS DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM RELAÇÃO A PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	139
FIGURA 24 – GRÁFICO DE ESCORES DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES MÉDIOS DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM RELAÇÃO AOS FABRICANTES DAS AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
CCD	Planejamento Composto Central
ETAAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica por Atomização Eletrotérmica)
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica em Chama)
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado)
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
PTFE	Politetrafluoroetileno Perfluoro Alcoxi
PFA	Perfluoro Alcoxi
POAs	Processos Oxidativos Avançados
R ²	Coefficiente de Determinação
<i>r</i>	Coefficiente de Correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UV-VIS	Ultravioleta – Visível
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
NEPA	Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentos
DLLME	Dispersive Liquid-liquid Microextraction (Microextração Líquido-líquido Dispersiva)
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia

USP	United States Pharmacopeia Convention
IAL	Instituto Adolfo Lutz
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
NATA	National Association of Testing Authorities
PE	Padronização Externa em meio aquoso
AP	Padronização por Adição de Padrão
PE-MIS	Padronização Externa em meio do solvente extrator
ACP	Análise de Componentes Principais
CP's	Componentes Principais

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O melado, considerado um subproduto do refino do açúcar, é obtido a partir da evaporação do caldo da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (TAKARA et al., 2007). É um xarope viscoso, marrom escuro ou amarelo âmbar, possui altos níveis de carboidratos fermentáveis (sacarose, glicose e frutose) e é rico em minerais como Fe, Mn, Ca, P, K e Zn e vitaminas, principalmente do complexo B e C, assim como em sais de ácidos inorgânicos e orgânicos e proteínas (CHAVES, FERNANDES e SILVA, 2005; NOGUEIRA et al., 2009; VALLI et al., 2012).

Por ser conhecido como um alimento rico em minerais, os consumidores acreditam que este apresenta muitos benefícios para a saúde. Além de ter um sabor e aroma bem característicos, o melado também possui uma boa aceitação no mercado, tanto interno quanto externo (CABALLERO et al., 2003; CARVALHO, 2007; ABIMAQ, 2009; WANG et al., 2011). Do ponto de vista nutricional, os macronutrientes Ca, Mg e K são essenciais para a manutenção do corpo humano. No entanto, alguns fatores podem afetar a quantidade desses minerais no açúcar e no melado de cana, tais como a variedade da cana, o clima, o solo, a colheita, o manejo, o método de extração do caldo, os métodos de clareamento, a pureza e a eficiência da remoção de impurezas no processo de fabricação (NAKNEAN e MEENUNE, 2011). Dessa forma, ressalta-se a importância da realização de estudos que determinem a quantidade de macro e micro minerais no melado de cana, uma vez que estes desempenham importantes funções no organismo.

A determinação de minerais em alimentos geralmente é feita por meio de diferentes procedimentos de preparo de amostras e técnicas analíticas. Entre as técnicas analíticas mais amplamente utilizadas estão a espectrometria de emissão atômica (fotometria de chama) (CASTANHEIRA et al., 2009; KLEIN, ENIZ e OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA, OLIVEIRA e VILLA, 2017), a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (RODRÍGUEZ-SOLANA et al., 2014; DASBASI et al., 2016; SILVA et al., 2019), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (SNEDDON et al., 2017; MRMOSANIN et al., 2018; MULLAPUDI et al., 2019), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (MOREDA-PIÑEIRO et al., 2018; PÉREZ-ÁLVAREZ et al., 2019) e a espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS (DHAVILE et al., 2008; MORAES et al., 2009; WEN et al., 2011). Dentre essas técnicas, a espectrometria de

absorção atômica com chama (F AAS) e a espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS se destacam por serem adequadas para análises mono-elementares sequenciais rápidas. Além disso, essas técnicas são de simples operação, apresentam sensibilidade, precisão nas medições e são de baixo custo em relação a aquisição/manutenção do equipamento, além de serem amplamente utilizadas para a determinação de macro e micronutrientes em matrizes alimentares (POHL e SERGIEL, 2009; OLIVEIRA, et al., 2010; NUNES, et al., 2011; STELMACH, POHL, STELMACH e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2014; GÓMEZ-NIETO et al., 2015).

No que diz respeito ao preparo de amostras, os métodos de digestão assistida por micro-ondas e a digestão com ácido por via úmida ou a digestão por via seca são geralmente usadas para determinação de metais (AFRIDI et al., 2006; SANTELLI et al., 2006; SOYLAK et al., 2007; CAMINI e HOEHNE, 2014; SOUSA e LISBOA, 2015). Contudo, apesar de sua vasta aplicação, estes procedimentos, apresentam algumas limitações como a utilização de altas temperaturas e/ou pressões que podem provocar a volatilização do analito de interesse ou, ainda, expor o analista à riscos de contaminação já que, muitas vezes, esses processos utilizam altos volumes de reagentes, além de serem processos demorados e com custo elevado de aquisição e manutenção do equipamento (LETERME et al., 2006; KRUG, 2006; SNEDDON et al., 2006; CAVECCI et al., 2008; MORAES et al., 2009; BADER, 2011; TUPINANBÁ et al., 2012). Devido a isso, técnicas de preparo de amostra alternativas aos procedimentos convencionais têm sido implantadas (NOGUEIRA et al., 2007; ANDOLFATTO, 2016; BRANDÃO, 2010; KRUG, 2010; MORAES et al., 2009). Estas tendem a aumentar a eficiência da extração, ou ainda ajudar o meio ambiente reduzindo o uso de reagentes e/ou a geração de resíduos, como é o caso da extração assistida por ultrassom (EAU).

A extração assistida por ultrassom (EAU) é considerada um método eficaz para a extração de compostos de amostras sólidas devido à sua rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo e menor volume de solventes (PINGRET, FABIANO-TIXIER e CHEMAT, 2013; CHEMAT et al., 2017). O mecanismo de ação para a extração assistida por ultrassom é atribuído à cavitação, as forças mecânicas e ao impacto térmico (KORN, PEREIRA e BORGES, 2005; KRUG, 2006; PAN et al., 2011). Este mecanismo favorece a extração de espécies químicas de materiais sólidos, bem como a sua dissolução ou mineralização completa no caso de compostos orgânicos, destruindo e quebrando a ligação do metal com essas moléculas (FRANCONY e PÉTRIER, 1996; NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; RUIZ –JIMÉNEZ et al.,

2003). Com isso, a EAU, como método de preparo de amostra, auxilia no processo de determinação dos metais por técnicas espectrométricas como o F AAS, evitando, por exemplo, o acúmulo de resíduos no queimador ou o entupimento do tubo capilar, quando a amostra é aspirada e posteriormente nebulizada no atomizador.

Contudo, a eficiência da extração assistida por ultrassom pode ser afetada por diferentes variáveis, tais como a composição do solvente, a temperatura, a amplitude do ultrassom e a relação sólido/solvente (CARRERA et al., 2012; SETYANINGSIH et al., 2016). Em virtude desses fatores, é necessário otimizar esses parâmetros de acordo com as condições da matriz de interesse. Geralmente, em metodologias analíticas, os procedimentos de otimização que envolvem ferramentas multivariadas têm sido mais utilizados, devido a apresentarem uma melhor eficiência, por serem econômicos além de permitirem que mais de uma variável seja otimizada ao mesmo tempo (MEIRA e DIAS, 2017).

Dessa forma, nesse estudo foi aplicado um planejamento de misturas do tipo simplex centróide para a determinação das proporções dos reagentes extratores e a partir destes foram estabelecidas as condições ótimas, com o intuito de desenvolver métodos analíticos rápidos, de baixo custo e ambientalmente amigáveis, por meio da extração assistida por ultrassom e das técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS, de metais em melado de cana, que permitissem a realização do monitoramento dos níveis desses micro e macronutrientes, visando a garantia e a qualidade do produto.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar métodos de extração assistida por ultrassom (EAU) para a determinação de metais essenciais em melado de cana pela espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e a espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS.

1.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver procedimentos de extração assistida por ultrassom (EAU) de Mg, Ca, Fe, Mn e de P em melado de cana pela aplicação de planejamento de misturas do tipo simplex centroide;
- ✓ Validar a metodologia de extração assistida por ultrassom (EAU) para determinação de Mg, Ca, Fe e Mn por F AAS e de P por espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS por meio de figuras de mérito como linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão, empregando diferentes técnicas estatísticas;
- ✓ Aplicar as metodologias de preparo de amostra otimizadas e validadas para a determinação de Mg, Ca, Fe e Mn por F AAS e de P por espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS em amostras de melado de cana de diferentes fabricantes e regiões do Brasil;
- ✓ Classificar e discriminar amostras de melado de cana por meio dos teores de metais e pela aplicação de ferramentas de análise multivariada, como a Análise de Componentes Principais (ACP).

REFERÊNCIAS

- ABIMAQ. Associação Brasileira da Indústria de Máquinas e Equipamentos. **Solução técnica: rapadura, melado e açúcar mascavo**, 2009.
- AFRIDI, H. I.; KAZI, T. G.; KAZI, G. H.; JAMALI, M. K. Effect of Ultrasound agitation on the Release of Heavy Elements in Certified Reference Material of Human Hair (CRM BCR 397), **J. AOAC Int.**, v. 89, p.1410–1417, 2006.
- ANDOLFATTO, S. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação direta de Mn, Zn, Fe e Mg em melado e melaço de cana utilizando a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)**. Guarapuava, 2016. 90f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, Paraná, 2016.
- BADER, N. R. Sample preparation for flame atomic absorption spectroscopy: an overview, **Rasayan J. Chem.**, v. 4, n. 1, p. 49-55, 2011.
- BRANDÃO, G. C. **Estratégias alternativas de preparo de amostras para a determinação de metais em alimentos por espectrometria de absorção atômica em chama**. Salvador, 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal da Bahia, 2010.
- CABALLERO, B.; TRUGO, L.; FINGLAS, P. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. Baltimore: Academic Press, 2003. 6289f.
- CAMINI, A.; HOEHNE, L. Avaliação da decomposição por micro-ondas e posterior determinação de cálcio por ICP-OES e FAAS em amostras de mortadela e carne mecanicamente separada. **Revista da Unifebe**, n.14, p. 9-23, 2014.
- 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.
- CARVALHO, R.F. **Beneficiamento dos derivados da cana de açúcar (melado e açúcar mascavo)**. Dossiê Técnico. Rede de Tecnologia da Bahia, 2007. 21p.
- CASTANHEIRA, I.; FIGUEIREDO, C.; ANDRÉ, C.; COELHO, I.; SILVA, A. T.; SANTIAGO, S.; FONTES, T.; MOTA, C.; CALHAU, M. A. Sampling of Bread for

Added Sodium as Determined by Flame Photometry. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 2, p. 621-628, 2009.

CAVECCI, B.; PADILHA P. M.; NEVES, R. C. F. Utilização da Extração Assistida por Ultrassom na Determinação da Disponibilidade de Nutrientes Inorgânicos em Rações Utilizadas na Dieta de Juvenis de Tilápia do Nilo. **Biblioteca Virtual FAPESP**, 2008.

CHAVES, J. B. P.; FERNANDES, A. R.; SILVA, C. A. da. Produção de açúcar mascavo, melado e rapadura: Capacidade 9 toneladas/dia de cana-de-açúcar. In: SILVA, C. A. B. da; FERNANDES, A. R. **Projetos de Empreendimentos Agroindustriais - Produtos de origem Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2005. Cap. 4. p. 119-169.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRES, A.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p.540-560, 2017.

DASBASI, T.; SACMAC, S.; CANKAYA, N.; SOYKAN, C. A new synthesis, characterization and application chelating resin for determination of some trace metals in honey samples by FAAS. **Food Chemistry**, v. 203, p.283-291, 2016.

DHAVILE, S. M.; SHEKHAR, R.; THANGAVEL, S.; CHAURASIA, S. C.; ARUNACHALAM, J. Determination of trace phosphorus in zirconium-niobium alloy and Zircaloy by UVVis spectrophotometry, **Talanta**, v. 76, p. 134-137, 2008.

FRANCONY, A.; PÉTRIER, C. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 77-82, 1996.

GÓMEZ-NIETO, B.; GISMERA, M. J.; SEVILLA, M. T.; PROCOPIO, J. R. Fast sequential multi-element determination of major and minor elements in environmental samples and drinking waters by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 854, p. 13-19, 2015.

KLEIN, A. L.; BRESCIANI, L.; OLIVEIRA, E. C. Características físico-químicas de biscoitos comerciais do tipo cookies adquiridos no vale do Taquari. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 7, n. 4, p. 167 - 73, 2015.

KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S. Algumas Aplicações Analíticas dos Ultrassons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 96, p. 51-6, 2005.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**, 1ª ed., Piracicaba, 2010.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDOÑO, A. M. Mineral Content of Tropical Fruits and Unconventional Foods of the Andes and the Rain Forest of Colombia. **Food Chemistry**, London, v. 95, n. 4, p. 644-652 2006.

MEIRA, L. A.; DIAS, F. de S. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 130, p.56-63, 2017.

MORAES, P. M.; LOUREIRO, V. R.; PADILHA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SALEH, M. A. D.; SANTOS, F. A.; SILVA, F. A. Determinação de Fósforo Biodisponível em Rações de Peixes Utilizando Extração Assistida por Ultrassom e Espectrofotometria no Visível. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 923-927, 2009.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; SÁNCHEZ-PIÑERO, J.; MAÑANA-LÓPEZ, A.; TURNES-CAROU, I.; ALONSO-RODRÍGUEZ, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S. Multi-element determinations in foods from Amazon region by ICP-MS after enzymatic hydrolysis assisted by pressurization and microwave energy. **Microchemical Journal**, v. 137, p.402-409, 2018.

MRMOSANIN, J. M.; PAVLOVICA, A. N.; KRSTICA, J. N.; MITICA, S. S.; TOSICA, S. B.; STOJKOVICA, M. B.; MICICB, R. J.; DORDEVICA, M. S. Multielement quantification in dark chocolate by ICP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p.163-171, 2018.

MULLAPUDI, V. B. K.; CHANDRASEKARAN, K.; VENKATESWARLU, G.; KARUNASAGAR, D. Development of a simple and rapid microwave-assisted extraction method using very dilute solutions of perchloric acid and hydrogen peroxide for the multi-elemental analysis of food materials by ICP-OES: A green analytical method. **Microchemical Journal**, v. 146, p.807-817, 2019.

NAKNEAN, P.; MEENUNE, M. Characteristics and antioxidant activity of palm sugar syrup produced in Songkhla Province, Southern Thailand. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 4, n. 4, p. 204-212, 2011.

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

NOGUEIRA, R. F. P.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R. A. da; VILLA, R. D.; OLIVEIRA, M. C. de. Fundamentos e Aplicações Ambientais dos Processos Fenton e Foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 400-408, 2007.

NOGUEIRA, F. dos S.; FERREIRA, K. S.; CARNEIRO JUNIOR, J. de B.; PASSONI, L. C. Minerais em melados e em caldos de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, p.727-731, 2009.

NUNES, L. S.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; LEMOS, V. A.; DOS SANTOS, W. N. L.; KORN, M. G. A.; TEIXEIRA, L. S. G. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 780–783, 2011.

OLIVEIRA, S. R.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. Determination of macro and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 4, p. 316–320, 2010.

OLIVEIRA, T. L. de; OLIVEIRA, A. P. de; VILLA, R. D. Solid-liquid extraction as a clean sample preparation procedure for determination of Na and K in meat products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 62, p.164-167, 2017.

PAN, Z.; QU, W.; MA, H.; ATUNGULU, G. G.; MCHUGH, T. H. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 1249–1257, 2011.

PÉREZ-ÁLVAREZ, E. P.; GARCIA, R.; BARRULAS, P.; DIAS, C.; CABRITA, M. J.; GARDE-CERDÁNA, T. Classification of wines according to several factors by ICP-MS multi-element analysis. **Food Chemistry**, v. 270, p.273-280, 2019.

PINGRET, F. D.; FABIANO-TIXIER, A. S.; CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction. In J. P. M. Rostagno (Ed.), **Natural product extraction: Principles and applications** (p. 89–112). Cambridge (UK): RSC Publishing, 2013.

POHL, P.; SERGIEL, I. Direct determination of the total concentrations of copper, iron and manganese and their fractionation forms in freshly ripened honeys by means of flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 168, n. 1-2, p. 9-15, 2009.

POHL, P.; STELMACH, E.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. Simplified sample treatment for the determination of total concentrations and chemical fractionation forms of Ca, Fe, Mg and Mn in soluble coffees. **Food Chemistry**, v.163, p.31-36, 2014.
RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; SALGADO, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CORTÉS, S. Assessment of minerals in aged grape marc distillates by FAAS/FAES and ICP– MS. Characterization and safety evaluation. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 49–55, 2014.

RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE-GARCIA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Dynamic ultrasound assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 231–237, 2003.

SANTELLI, R.; BEZERRA, M. A.; SANTANA, O. D.; CASSELLA, R. J.; FERREIRA, S. L. C. Multivariate technique for optimization of digestion procedure by focused microwave system for determination of Mn, Zn and Fe in food samples using FAAS. **Talanta**, v. 68, n. 4, p.1083-1088, 2006.

SETYANINGSIH, W.; DUROS, E.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of melatonin from red rice (*Oryza sativa*) grains through a response surface methodology. **Applied Acoustics**, v. 103, p. 129–135, 2016.

SILVA, D. dos S.; SANTOS, C. S. dos; PANDO, L. A.; GOMES, S. R.; NOVAES, C. G.; SANTOS, W. N. L. dos; BEZERRA, M. A. Doehlert design in the optimization of ultrasound assisted dissolution of fish fillet samples with tetramethyl ammonium hydroxide for metals determination using FAAS. **Food Chemistry**, v. 273, p.71-76, 2019.

SNEDDON, J.; HARDAWAY, C.; BOBBADI, K. K.; REDDY, A. K. Sample Preparation of Solid Samples for Metal Determination by Atomic Spectroscopy—An Overview and Selected Recent Applications, **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 1, 2006.

SNEDDON, E. J.; HARDAWAY, C. J.; SNEDDON, J.; BOGGAVARAPU, K.; TATE, A. S.; TIDWELL, S. L.; GARY, D. P.; DOUVRIS, C. Determination of selected metals in rice and cereal by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). **Microchemical Journal**, v. 134, p.9-12, 2017.

SOUSA, R. A.; LISBOA, T. P. Determinação de Fe e Zn em queijos Petit Suisse: aspectos analíticos e teores encontrados em amostras comerciais. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 1, p. 35-43, 2015.

SOYLAK, M.; TUZEN, M.; SOUZA, A. S.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, S. L. C. Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc,

copper and nickel in 13 tea samples employing flame atomic absorption spectrometry, **J. Hazard. Mater.**, v. 149, p. 264–268, 2007.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, 1956–1961, 2013.

TAKARA, K.; OTSUKA, K.; WADA, K.; IWASAKI, H.; YAMASHITA, M. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity and Tyrosinase Inhibitory Effects of Constituents of Sugarcane Molasses. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 71, n. 1, p.183-191, 2007.

VALLI, V.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; DINUNZIO, M.; DANESI, F.; CABONI, M. F.; BORDONI, A. Sugar Cane and Sugar Beet Molasses, Antioxidant-rich Alternatives to Refined Sugar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 51, p.12508-12515, 2012.

WANG, B.; CHANG L.; KANG, Z.; CHU, H.; TAI, H.; HUANG, M. Inhibitory effects of molasses on mutation and nitric oxide production. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p.1102-1107, 2011.

WEN, X.; YANG, Q.; YAN, Z.; DENG, Q. Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 97, n. 2, p.249-254, 2011.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MELADO DE CANA DE AÇÚCAR

De acordo com a resolução 12/33 e 35 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde, o melado é um “líquido xaroposo obtido pela evaporação do caldo de cana (*Saccharum officinarum* L.) ou a partir da rapadura por processos tecnológicos adequados” (ANVISA, 1978). Também é um alimento constituído principalmente por açúcares (em torno de 55% (m/m) (WANG et al., 2011). Contudo, para não oferecer riscos à saúde do consumidor deve apresentar algumas características físico-químicas como: umidade máxima de 25% (m/m), acidez em solução normal máximo de 10% (m/v), glicídios totais mínimo de 50% (m/m), resíduo mineral (cinzas) máximo de 6% (m/m) e uma concentração de açúcar em torno de 65 a 74° Brix (SILVA, CESAR e SILVA, 2003). Além disso, para se ter uma garantia da qualidade do produto final, o melado de cana deve ser produzido com matéria-prima (caldo de cana) não fermentada, isenta de materiais terrosos e detritos (animais ou vegetais), além de ser proibida a adição de essências, corantes, edulcorantes ou conservantes (ANVISA, 1978).

Para se obter um produto de qualidade, todas as etapas do processo de fabricação do melado devem ser feitas com o devido cuidado. Inicialmente o caldo é extraído da cana-de-açúcar por moagem, apresentando em média 80% de água e 20% de matéria sólida (CARVALHO, 2007). Após essa etapa, são removidas as impurezas grosseiras presentes no caldo de cana, com posterior purificação, em que, fazendo uso de calor, são retirados os componentes que floculam. Essas etapas são importantes para obter um caldo de cana mais limpo (SILVA, CESAR e SILVA, 2003; ANDRADE, 2014). Em seguida, se faz a inversão da sacarose presente no caldo, pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose, obtendo, assim um maior teor de açúcares redutores. Tal processo pode ser realizado por via enzimática (com uso da enzima invertase) ou ácida (pela utilização dos ácidos tartárico ou cítrico) (SILVA, CESAR e SILVA, 2003; SILVA, 2012). E por fim, é realizada a concentração do caldo até a obtenção de um xarope com teor de sólidos entre 65 e 75 °Brix. Tendo alcançado a concentração ideal, o produto é resfriado, até temperatura próxima de 85 °C e então é feito o envasamento para a comercialização (SILVA, CESAR e SILVA, 2003).

O melado é um alimento de grande importância nutricional e é consumido em várias regiões do país, sendo que cada 100 g do produto fornece em média 300 calorias (CARVALHO, 2007). Usualmente, o melado é consumido como adoçante e pode ser

utilizado como um ingrediente para a confecção de pães, biscoitos e bolos ou ainda ser consumido puro (WANG et al., 2011). Além disso, o melado é utilizado também como ingrediente na indústria de confeitaria, bebidas, balas e até mesmo como substituto do xarope no acondicionamento de alguns tipos de frutas em conserva (CARVALHO, 2007; SILVA, 2012).

Também é considerado um alimento rico em minerais. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), em 100 g do produto podem ser encontrados cerca de 5,4 mg de ferro, 395 mg de potássio, 74 mg de fósforo, 4,0 mg de sódio, 0,85 mg de cobre, 115 mg de magnésio, 0,3 mg de zinco, 2,6 mg de manganês e 102 mg de cálcio (NEPA/UNICAMP, 2006). No que diz respeito aos minerais, o Fe, o Zn e o Mn são micronutrientes necessários para o corpo humano em quantidades muito pequenas (geralmente menos de 100 mg/dia); já os macronutrientes, como o Na, o Ca, o Mg e o K, são exigidos em quantidades maiores. Esses minerais são componentes essenciais nas estruturas biológicas, contudo a deficiência ou concentrações elevadas destes no organismo, podem ainda, estar associadas a algumas doenças como as cardiovasculares, as renais, a hipertensão (relacionada ao excesso de sódio) e a anemia (relacionada à deficiência de ferro) (FRAGA, 2005; LOBO e TRAMONTE, 2004; NILSON et al., 2012; SARNO et al., 2013).

2.2 IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS NO MELADO DE CANA

Os minerais são compostos inorgânicos ingeridos principalmente por meio da alimentação e desempenham importantes funções metabólicas no organismo. Geralmente, estão ligados a proteínas ou a moléculas menores, como fosfatos, fitatos, polifenóis e/ou outros compostos com características quelantes. A maioria dos metais faz parte de sistemas enzimáticos, possuem funções estruturais e são transportados por meio das proteínas pelo organismo, para exercerem suas funções (FRAGA, 2005).

Diferente de alguns compostos orgânicos, que podem ser destruídos durante a cocção dos alimentos, isso não ocorre com a maioria dos minerais. Sua concentração no produto final é até maior quando é feita a concentração da matéria-prima, como ocorre na fabricação do melado. Entretanto, a presença de minerais nos alimentos também pode ser devido à ocorrência de contaminações durante o cultivo e o processamento, pois a presença de metais em alimentos é frequentemente determinada pela disponibilidade destes no solo (NOGUEIRA et al., 2009).

No melado de cana, é o caldo que conserva todos os nutrientes da cana-de-açúcar, como ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio, manganês e zinco, além de vitaminas do complexo B e C (FAVA, 2004).

Esses minerais, presentes na composição química do melado, possuem funções importantes para a saúde humana e são componentes essenciais das estruturas biológicas. Apesar disso, sua deficiência/carência pode causar doenças ou ainda, em concentrações elevadas podem ser tóxicos ao organismo (FRAGA, 2005).

O melado é popularmente indicado como fonte de ferro. De acordo com a RDC n. 360 de 23 de dezembro de 2003, o teor de ferro em melado corresponde a 39 % do valor recomendado na ingestão diária da população (BRASIL, 2003). O ferro é bem conservado pelo organismo, sendo que cerca de 90 % deste mineral é recuperado e reutilizado. Embora este elemento esteja presente no corpo humano em quantidades pequenas, suas funções são essenciais à vida, como, por exemplo, na constituição das células vermelhas do sangue (NOGUEIRA et al., 2009). Ainda, a deficiência crônica de ferro pode causar anemia, devido a redução do número de células vermelhas no organismo, o que gera a diminuição da oxigenação das células do corpo (LEHNINGER et al., 2002).

No que diz respeito ao manganês, este é um nutriente inorgânico associado as funções fisiológicas do organismo, ao desenvolvimento ósseo e ao metabolismo de aminoácidos, lipídios e carboidratos. Os sinais de deficiência incluem desempenho reprodutivo ruim, retardo de crescimento, malformações congênitas, disfunção dos ossos e cartilagem e baixa tolerância à glicose (GOLDHABER, 2003). Excesso de ferro, magnésio e cálcio também podem causar deficiência de manganês (VITTI et al., 2005).

O cálcio é um elemento fundamental ao organismo, e sua importância está relacionada às funções que desempenha nas estruturas ósseas e biológicas como a contração muscular, coagulação sanguínea, transmissão do impulso nervoso ou sináptico (MILLER, JARVIS e MCBEAN, 2001; COBAYASHI, 2004). O consumo de cálcio também previne doenças como a osteoporose, hipertensão arterial, obesidade e câncer de cólon (GUÉGUEN e POINTILLART, 2000). Alguns componentes da alimentação como os fitatos podem formar complexos insolúveis com o cálcio, reduzindo a sua absorção (PEREIRA et al., 2009). Em produtos vegetais, sua deficiência pode ser causada pelo uso de vinhaça no solo, na qual o teor de potássio é muito elevado, competindo então na absorção do cálcio pela planta (VITTI et al., 2005).

O fósforo é classificado como um macromineral e é parte integrante dos ossos, dentes e de algumas proteínas musculares (MORAES et al., 2009). Participa do processo intermediário da formação da parede intestinal, na atividade das enzimas digestivas e na formação dos ossos, inibindo a absorção de outros elementos devido à formação de complexos como ferro-fitatos (BASU e DICKERSON, 1996). É encontrado no caldo da cana na forma mineral e orgânica. A maior parte desse elemento se encontra na forma solúvel. A forma orgânica do fósforo ocorre numa quantidade de cerca de 10 % do fósforo total (KORNDORFER, 1990). O nível de fósforo orgânico no caldo é, principalmente, devido ao grau de maturação da cana (HONIG, 1960).

O magnésio tem um papel fundamental no metabolismo da glicose, na homeostase insulínica e glicêmica, na síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Atua ainda na estabilidade da membrana neuromuscular e cardiovascular e como regulador fisiológico da função hormonal e imunológica (ELIN, 2010; VOLPE, 2013). Sua absorção pelo organismo é afetada pela presença de alimentos ricos em fitatos, oxalatos, fosfatos e fibras alimentares, que diminuem sua biodisponibilidade (SEVERO et al., 2015). A deficiência de magnésio está associada a doenças ou fatores condicionantes, como distúrbios na absorção intestinal ou na homeostase, ou ainda a casos de perdas excessivas de tecidos corporais (SARIS et al., 2000). Em produtos vegetais, a deficiência de magnésio pode ocorrer devido ao excesso de cálcio que é absorvido pelas plantas (MARSCHNER, 1999).

2.3 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS

Entre as técnicas de espectrometria mais sensíveis para a determinação de minerais em amostras alimentares, pode-se citar a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (POHL, 2009; RODRÍGUEZ-SOLANA et al., 2014; SILVA et al., 2019), a espectrometria de absorção atômica por atomização eletrotérmica (ET AAS) (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2007; BAKKALI et al., 2009; FRANCISCO, BRUM e CASSELLA, 2015; TUZEN et al., 2018), a espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP-OES) (SNEDDON et al., 2017; MRMOSANIN et al., 2018; MULLAPUDI et al., 2019) e a espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS (CHAGAS, CORREA e ALMEIDA, 2014; KLEIN, ENIZ e OLIVEIRA, 2015).

A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) é adequada para análises mono-elementares sequenciais rápidas e tem sido amplamente utilizada para a determinação de macro e micronutrientes em amostras agrícolas, ambientais e alimentares. Uma das principais características dessa técnica é a separação dos metais, para sua determinação, pela etapa de atomização (SKOOG et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010, NUNES et al., 2011; STELMACH, POHL e SZYMCZYCHA-MADEJA, 2013; GÓMEZ-NIETO et al., 2015).

Referente a espectrometria de absorção molecular no UV-VIS, essa técnica se baseia em transições eletrônicas intra-atômicas ou moleculares, com absorção de radiação luminosa na região do ultravioleta (200-400 nm) e no visível (400-800 nm) (TREVISAN e POPPI, 2006; HARRIS, 2006). Visa determinar a concentração de uma substância, em condições bem definidas, pela medida da absorção de luz, tendo como referência a absorção da substância numa concentração conhecida. A principal vantagem desse método é de proporcionar um meio simples para determinar pequenas quantidades de substâncias (SAGIO et al., 2007). É geralmente empregada no monitoramento de processos de polimerização, biológicos, petroquímicos, farmacêuticos e alimentares (TREVISAN e POPPI, 2006).

Na literatura são encontrados poucos estudos empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) para a quantificação de metais em melado de cana (NOGUEIRA et al., 2009; ANDOLFATTO, 2016) e foi constatado apenas um trabalho para a determinação de espécies inorgânicas nessa matriz por espectrometria molecular no UV-VIS (NOGUEIRA et al., 2009). Devido a isso, se dá a importância de realizar estudos com a finalidade de se ter um maior controle dos níveis de minerais presentes nos produtos derivados da cana-de-açúcar.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O PREPARO DE AMOSTRA

O método de preparo de amostra é uma etapa analítica importante para o isolamento e a identificação dos compostos de interesse das amostras sólidas antes da determinação por métodos cromatográficos e espectrométricos, pois convertem o material sólido em uma solução compatível para a instrumentação (NAOZUKA et al., 2011). Entretanto, o desenvolvimento de um procedimento que gere bons resultados para a extração dos compostos de interesse, a partir de amostras de alimentos, pode ser

um trabalho difícil devido à diversidade estrutural da matriz (SETYANINGSIH et al., 2015).

Técnicas de digestão de amostras, como a digestão assistida por micro-ondas e a digestão com ácido por via úmida ou por via seca, têm sido amplamente usadas para determinação de metais (AFRIDI et al., 2006; SOYLAK et al., 2007; SANTELLI et al., 2006; CAMINI e HOEHNE, 2014; SOUSA e LISBOA, 2015).

A digestão por via seca consiste na calcinação ou oxidação da amostra por decomposição térmica em uma mufla a temperaturas de cinzas de 450 a 550 °C, com posterior dissolução das cinzas em um ácido apropriado (KRUG, 2010).

A digestão ácida por via úmida em frasco aberto utiliza ácidos minerais ou oxidantes e uma fonte de calor externa para decompor a matriz da amostra. Em geral, o ácido nítrico é usado como oxidante sozinho ou em combinação com outros ácidos (por exemplo, ácido sulfúrico e ácido clorídrico) ou às vezes com peróxido de hidrogênio (NÓBREGA et al., 2006).

A digestão assistida por micro-ondas se baseia em colocar a amostra em um frasco (ou bomba), geralmente construído de um polímero fluorado, como politetrafluoroetileno (PTFE) ou perfluoro alcoxi (PFA). Após a adição dos reagentes de digestão, a bomba é bem fechada e colocada no forno de micro-ondas para irradiação por energia de micro-ondas (JIN et al., 1999; MORGANO et al., 1999; BADER, 2011). Porém, tais técnicas de digestão requerem o uso de ácidos concentrados e altas temperaturas, e frequentemente altas pressões, e isso pode afetar a liberação total dos elementos, gerar contaminações e até mesmo oferecer riscos ao analista, além de serem procedimentos de custo elevado, demorados e limitados, já que dependem de determinadas quantidades de reagentes e de massa de amostra (CAVECCI et al., 2008; MORAES et al., 2009).

Dessa forma, técnicas de preparo de amostra alternativas aos procedimentos convencionais podem aumentar a eficiência da extração ou ainda ajudar o meio ambiente reduzindo o uso de reagentes e/ou a geração de resíduos. Exemplos são os processos oxidativos avançados (POAs), a análise por amostragem em suspensão e a extração assistida por ultrassom (EAU).

Os POAs consistem na formação do radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$), que é uma espécie oxidante altamente reativa capaz de quebrar ligações de caráter covalente e induzir a mineralização completa dos compostos orgânicos da amostra (CARVALHO et al., 2007). O radical hidroxila pode reagir por meio da abstração de hidrogênio, pela

transferência de elétrons e pela adição radicalar. Estudos consideram os radicais hidroxilas, os agentes mais importantes envolvidos no processo de oxidação da matéria orgânica (BRITTO et al., 2008; BRANDÃO, 2010). Contudo, estes processos têm como desvantagem a limitação econômica, implicando em alto custo de manutenção e do agente oxidante (DEZOTTI, 2008).

A análise por amostragem em suspensão se baseia em um sistema heterogêneo, que contém uma fase sólida ou semissólida (amostra) dispersa em um fluido (água, solvente, etc.) (KRUG, 2010; ANDRADE, 2013; ANDOLFATTO, 2016). Essa técnica depende de fatores como a homogeneidade e o tamanho das partículas em solução. Dessa forma, a manutenção desses fatores no momento da detecção no equipamento pode comprometer a exatidão do método analítico (FERREIRA et al., 2010).

Nesse contexto, a extração assistida por ultrassom pode ser considerada uma alternativa viável para o pré-tratamento de amostras sólidas, pois sua energia facilita e acelera alguns passos, como dissolução, fusão e lixiviação, proporcionando maiores rendimentos de recuperação em comparação com as extrações clássicas. A técnica também preserva os analitos de interesse nos extratos além de ser um procedimento baseado nos princípios da química verde (NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; LIANFU e ZELONG, 2008; PINGRET et al., 2012). Os princípios da química verde visam, em particular, a obtenção da redução dos tempos de processamento, a aceleração das transferências de calor e de massa, a melhoria da qualidade do produto e ainda permitem a redução das quantidades de solventes e favorecem o uso de solventes GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) (GALANAKIS, 2013; CHEMAT, VIAN e CRAVOTTO, 2012).

2.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU)

A extração assistida por ultrassom (EAU) é considerada um método eficaz para a extração de compostos de amostras sólidas (PINGRET, FABIANO-TIXIER e CHEMAT, 2013; CHEMAT et al., 2017). Seu mecanismo de ação é atribuído à cavitação, forças mecânicas (ondas que se propagam através de qualquer meio material com frequência maior que 20 kHz) e impacto térmico (aumento da temperatura na microrregião onde ocorre o colapso das microbolhas durante a sonicação), o que resulta na ruptura das paredes das células, reduz o tamanho das partículas e melhora a transferência de massa através das membranas celulares (KORN, PEREIRA e

BORGES, 2005; KRUG, 2010; PAN et al., 2011). A cavitação acústica é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transitórias em líquidos expostos a ondas ultrassônicas de baixa frequência (< 1 MHz). Assim, a energia liberada durante a cavitação acústica oferece boas perspectivas para a preparação e/ou tratamento de amostras, já que a mesma auxilia na quebra de ligações entre o material sólido e a matéria orgânica, facilitando a extração dos metais (KORN, PEREIRA e BORGES, 2005; MORAES et al., 2009). Dessa forma, a extração de metais essenciais para o consumo humano, de amostras alimentares por sonicação permite a eliminação da mineralização ácida (SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2007; HOSSAIN et al., 2012).

Contudo, alguns estudos observaram que a eficiência da extração assistida por ultrassom pode ser afetada por variáveis tais como a composição do solvente extrator, a temperatura, a amplitude do ultrassom, o pH do solvente e a relação sólido/solvente. Também há o efeito de cavitação em banhos ultrassônicos, que muitas vezes não é homogêneo, podendo variar em função das dimensões e da posição dos frascos no interior do ultrassom (NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; ALEIXO et al., 2004; PERONICO, 2014; CARRERA et al., 2012; SETYANINGSIH et al., 2016). Em virtude disso, se torna necessário otimizar esses parâmetros de acordo com as condições da matriz de interesse.

Alguns estudos têm desenvolvido e validado métodos de extração assistida por ultrassom em matrizes alimentares e descrevem a influência do efeito dessas variáveis na extração de espécies inorgânicas.

Machado, Bergmann e Pistón (2016) fizeram uso de EAU para determinação de Fe e Zn em fórmulas infantis a base de leite. Os autores avaliaram o efeito do HNO_3 como reagente extrator e observaram que a utilização de HNO_3 (15 %, v.v⁻¹) e 5 minutos de sonicação, foram consideradas condições ótimas para a extração quantitativa de ambos os elementos. A influência das três variáveis (concentração de ácido nítrico, amplitude de sonicação e tempo) foi avaliada por meio de um delineamento composto central de três níveis (CCD). As estimativas de precisão e de exatidão do procedimento foram obtidas comparando-se os resultados com a digestão ácida e fazendo o uso do cálculo de desvios padrão relativos, obtendo-se valores de 3,3 e 4,1% para ferro e zinco, respectivamente. Os resultados foram estatisticamente equivalentes aos valores obtidos pelo método de referência.

Nascentes, Korn e Arruda (2001) consideraram a EAU como um método rápido e preciso na extração de Ca, Mg, Mn e Zn de vegetais. Foram estabelecidas condições

de otimização como a concentração de ácido nítrico, o tempo de sonicação e o tamanho de partícula. As melhores condições para a extração foram de 0,14 mol L⁻¹ de HNO₃, 10 minutos de sonicação e tamanho de partícula < 75 µm. A precisão da extração ultrassônica para o método proposto foi determinada comparando-se os resultados com os obtidos usando a digestão assistida por micro-ondas. Além disso, não foram observadas diferenças significativas no nível de 95% de confiança, com faixas de recuperação entre 96 a 102% para diferentes vegetais o que indicou que o método de extração assistida por ultrassom é aplicável para este tipo de amostra.

Peronico e Raposo Jr. (2016) também fizeram uso do banho ultrassônico como procedimento de extração de Cu, Mn, Ca e Mg em culturas de oleaginosas. Os melhores resultados foram obtidos quando 0,3 gramas de amostra foram utilizadas para extrair o conteúdo mineral usando 10 mL de uma solução de 1,4 mol L⁻¹ de HNO₃ em 10 minutos de sonicação a 25 °C. Para validar o método otimizado, os autores fizeram uso de testes de recuperação com base em materiais de referência certificados (MRC) comparando-se os resultados pelo teste-*t* no nível de 95% de confiança para avaliar a exatidão, bem como avaliaram os limites de quantificação e detecção (LQ e LD) e a precisão do método pelo cálculo dos desvios padrão relativos. Os desvios-padrão relativos variaram entre 0,52 a 6,13% para todas as amostras e os limites de detecção foram de 666,7 µg g⁻¹, 416,7 µg g⁻¹, 333,4 µg g⁻¹ e 3,5 mg g⁻¹ para Cu, Mn, Ca e Mg, respectivamente. Os resultados demonstraram que não há diferenças significativas no nível de 95 % de confiança, entre o método de extração assistida por ultrassom e a digestão assistida por de micro-ondas (método de referência).

A partir disso, foi constatado que o método de extração assistida por ultrassom tem sido empregado em diversos tipos de matrizes, contudo ainda são escassos estudos voltados para matrizes alimentares com altos teores de açúcar, como é o caso do melado de cana, o que ressalta a importância da realização deste trabalho.

2.6 APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO DE MISTURAS PARA A OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Planejamentos de mistura são ferramentas multivariadas comumente empregadas para otimizar as proporções dos componentes de uma mistura. Nesse planejamento, os níveis das variáveis de mistura são mutuamente dependentes e devem fornecer uma soma constante igual a 1, sendo que a resposta obtida depende das proporções dos

componentes da mistura e não de seu valor absoluto (NOVAES et al., 2016; BEZERRA et al, 2019).

A otimização dos parâmetros do método de extração assistida por ultrassom pode ser conduzida por meio de um planejamento de misturas do tipo simplex centroide que estabelece, por meio de modelos estatísticos, uma proporção ideal entre os componentes de uma mistura. A aplicação deste planejamento permite avaliar a eficiência de extração dos solventes com diferentes proporções (NOVAES et al., 2016).

Em geral, a mistura consiste de q componentes, em que x_i representa a proporção desses componentes i na mistura. Conforme a Equação 1:

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

Equação 1

$$x_i > 0 \quad i = 1, 2, \dots, q$$

Variando a proporção dos componentes da mistura entre 0 a 1, pode-se obter misturas binárias (proporções iguais de dois solventes) e misturas ternárias (que correspondem ao ponto central do planejamento). Ressalta-se, ainda, que o tipo de planejamento adotado em cada estudo é dependente do número de variáveis que se deseja analisar. Assim, de acordo com Myers, Montgomery e Anderson-Cook (2016), quando se tem três componentes, o planejamento de misturas é um sistema de coordenadas simplex, sendo este similar a um triângulo equilátero, em que os vértices correspondem às três misturas puras (1,0,1; 0,1,0; 0,0,1) e as arestas são as misturas binárias dos componentes ($\frac{1}{2}; \frac{1}{2}$). No centro do triângulo estão as misturas em que os três componentes estão presentes em quantidades proporcionais diferentes de zero. Assim, o centróide do triângulo corresponde à mistura com proporções iguais a $\frac{1}{3}; \frac{1}{3}; \frac{1}{3}$ de todos os componentes.

O planejamento de misturas simplex centroide, utiliza como resposta uma abordagem matemática, que se baseia nas funções desejáveis aplicadas para a otimização de experimentos com múltiplas respostas (DERRINGER e SUICH, 1980). A abordagem consiste em converter cada resposta y_i em uma função de desejo individual d_i , que varia dentro do intervalo $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for a desejada, apresentará $d_i = 1$. O sistema é considerado otimizado quando as variáveis estudadas permitem a

obtenção das melhores condições (com valores máximos, mínimos ou ainda, quando se quer alcançar um valor alvo) ou quando se obtém a melhor resposta entre elas (quando várias variáveis são consideradas ao mesmo tempo) (NOVAES et al., 2016). Assim, a otimização da metodologia aplicada neste trabalho, é baseada no cálculo das variáveis que maximizem a desejabilidade da extração, que é dada pela expressão:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m}$$

Equação 2

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

Em que m é o número de variáveis de resposta, L será o menor valor aceito como resposta e s , o peso. Dessa forma, quando $s = 1$, a função de desejabilidade será linear.

Na literatura, são comumente encontrados estudos, que fazem uso de um planejamento de misturas do tipo simplex centroide, para a determinação de compostos fenólicos e antioxidantes por técnicas cromatográficas (MOREIRA e SOUZA DIAS, 2018; BAJ, BARYLUK e SIENIAWSKA, 2018; MARCHEFAVE et al., 2019; SILVA et al., 2019). Contudo, este tipo de planejamento também pode ser empregado no desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de metais em diferentes tipos de matrizes por F AAS.

Souza Dias et al. (2011) aplicaram um planejamento de misturas do tipo simplex centroide para a otimização da composição da fase líquida para determinação de Fe em folhas de mandioca usando F AAS. Este procedimento baseou-se na determinação das melhores proporções de uma mistura composta de HNO_3 , HCl e H_2O_2 , após a aplicação do método de extração assistida por ultrassom. Os modelos de regressão linear, quadrático e cúbico especial foram ajustados aos dados experimentais e uma análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificar a significância estatística dos três modelos. A análise de um gráfico de contorno também auxiliou na determinação da região ótima que maximizava as respostas. O melhor ajuste foi obtido para o modelo quadrático, mostrando que a melhor região experimental foi caracterizada por baixas proporções de H_2O_2 , em que as maiores respostas foram obtidas.

Meira e Souza Dias (2017) descrevem um método para extração e pré-concentração de Cd em amostras de água e sedimentos usando DLLME e determinação por F AAS. O volume de mistura (solvente de extração, de dispersão e um reagente de complexação) foi otimizado utilizando um planejamento de misturas do tipo simplex centróide, em que foram feitas triplicatas do ponto central com o intuito de avaliar o erro experimental. Os autores também aplicaram aos dados experimentais uma regressão para ajustar os modelos linear, quadrático e cúbico especial e, consecutivamente, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a falta de ajuste e a significância do modelo quadrático ajustado ($p > 0,05$). Com isso, foi possível verificar que as melhores características analíticas do método proposto para a extração de cádmio utilizando a micro extração líquido-líquido dispersiva, em relação as proporções do solvente dispersor, solvente extrator e reagente complexante foram obtidas com 140 μL do solvente extrator, 200 μL do reagente complexante e 660 μL do solvente dispersor.

Bezerra et al. (2010) desenvolveram um método para determinar Mn e Zn em folhas de chá (infusões) por amostragem em suspensão e determinação por F AAS. Neste estudo, as proporções entre os componentes da fase líquida (ácidos e surfactantes) foram otimizadas pelo uso de um planejamento de misturas. Soluções de ácidos nítrico e clorídrico e misturas destes dois ácidos em diferentes concentrações foram avaliadas como fase líquida na preparação das suspensões. Para permitir a otimização simultânea das respostas foram aplicadas as funções de desejabilidade. Uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar o modelo quadrático ajustado aos dados experimentais, assim como um gráfico de contorno, em que o modelo ajustado não apresentou falta de ajuste (*valor de $p > 0,05$*). A partir do planejamento de misturas, cujas coordenadas são as proporções dos componentes da mistura, os autores verificaram que a fase líquida otimizada é composta por 2,0 mol L⁻¹ de ácido clorídrico, 2,0 mol L⁻¹ de ácido nítrico e proporções de 50%, 12% e 38% de soluções Triton X100 (2,5%), respectivamente.

Costa et al. (2018) descrevem um procedimento de extração assistida por ultrassom e de digestão assistida por micro-ondas, com ácido diluído para determinar Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e Mn em cascas de mandioca por F AAS. A otimização dos volumes das soluções de ácidos nítrico, clorídrico e acético foi realizada a partir de um planejamento de misturas. Os modelos linear e quadrático foram ajustados aos dados experimentais com a finalidade de se obter a melhor descrição da região experimental.

Os autores também avaliaram as condições de cada variável por meio de um gráfico de contorno, com base no modelo ajustado (modelo quadrático). Para avaliar o modelo quadrático ajustado, foi aplicado um *teste F* de falta de ajuste, em que não foi verificado falta de ajuste para o modelo quadrático ($F_{calculado} = 0,66 < F_{crítico} = 5,59$ com $p > 0,05$). Para este estudo, o planejamento de misturas mostrou que a condição ótima para a extração de Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e Mn foi obtida quando se utilizava 6,2 mL de HNO₃, 2,1 mL de HCl e 1,7 mL de CH₃COOH.

Com base nisso, foi constatado que apesar de ferramentas multivariadas, como é o caso do planejamento de misturas, serem empregadas em diversos tipos de matrizes para a determinação de metais pela técnica espectrométrica de absorção atômica com chama (F AAS), ainda não foram observados estudos, usando essa ferramenta estatística, em matrizes alimentares ricas em açúcares.

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Quando se visa o desenvolvimento de metodologias analíticas, recomenda-se ter em consideração a disponibilidade de equipamentos, a simplicidade do procedimento e a rapidez das determinações (MACHADO, BERGMANN e PISTÓN, 2016). No entanto, quando se faz uso de um método analítico em um laboratório, é preferível que um processo de avaliação seja feito, para assim, se ter a estimativa da eficiência e garantir a confiabilidade estatística dos dados, sendo este processo denominado de validação (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004). Na área de análise de alimentos, a validação de métodos está principalmente associada com a segurança alimentar, a qualidade e a garantia de mercado do produto (SOUZA, 2007).

Uma maneira de assegurar a aplicabilidade de um método é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio das estimativas das figuras de mérito. As figuras de mérito ou parâmetros de validação são os principais indicadores do bom desempenho e da confiabilidade da metodologia desenvolvida (RIBEIRO e FERREIRA, 2008).

Linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez são geralmente os principais parâmetros avaliados nos estudos de validação (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2018).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância estudada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 2005; USP, 2005). Em métodos espectrométricos,

geralmente a linearidade é avaliada por meio do coeficiente de correlação (r) ou pela análise de regressão linear (ANVISA, 2017; MIRANDA et al., 2015; ARAUJO et al., 2007; PERONICO e RAPOSO Jr., 2016).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental; o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 2005; INMETRO, 2018). O LD e o LQ podem ser calculados pelo método visual, de relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica. Geralmente, em métodos espectrométricos, utiliza-se o método da curva analítica (RIBEIRO e FERREIRA, 2008; ARAUJO et al., 2007; FERREIRA et al., 2014; PERONICO e RAPOSO Jr., 2016; ANDOLFATTO, 2016).

A exatidão relaciona o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio com um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005; INMETRO, 2018). Pode ser avaliada por meio do uso de material de referência certificado (MRC), por ensaios de recuperação ou, ainda, pela comparação de métodos (ARAUJO, 2009). Em técnicas espectrométricas, geralmente se faz uso desses três métodos para avaliar a exatidão (PERONICO e RAPOSO Jr., 2016; ARAUJO et al., 2007; MORAES et al., 2009; KAZI et al., 2009; FERREIRA et al., 2014; MACHADO, BERGMANN e PISTÓN, 2016).

A precisão está associada a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, sendo estas semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 2005; INMETRO, 2018). Este parâmetro é expresso em termos de desvios padrão relativos (DPR %) ou por meio do coeficiente de variação (CV) (RIBEIRO e FERREIRA, 2008). A precisão em estudos de validação de métodos é considerada em níveis de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2018). Na validação de métodos espectrométricos, a precisão normalmente é avaliada pela comparação de métodos de preparo de amostra ou pelo cálculo dos desvios padrão relativos (NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; ARAUJO et al., 2007; MORAES et al., 2009; KAZI et al., 2009; FERREIRA et al., 2014; PERONICO e RAPOSO Jr., 2016; MACHADO, BERGMANN e PISTÓN, 2016).

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta diante de pequenas variações (INMETRO, 2018). Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por pequenas e deliberadas modificações em seus parâmetros, ou seja, um

método só é considerado robusto se mantiver sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise (outros laboratórios, analistas ou equipamentos) (RIBANI et al., 2004). Esta figura de mérito não é comumente analisada em métodos espectrométricos.

REFERÊNCIAS

- AFRIDI, H. I.; KAZI, T. G.; KAZI, G. H.; JAMALI, M. K. Effect of Ultrasound agitation on the Release of Heavy Elements in Certified Reference Material of Human Hair (CRM BCR 397), **J. AOAC Int.**, v. 89, p.1410–1417, 2006.
- ALEIXO, P. C.; JÚNIOR, D. S.; TOMAZELLI, A. C.; RUFINI, I. A.; BERNDT, H.; KRUG, F. J. Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, n. 2, p. 329–337, 2004.
- ANDOLFATTO, S. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação direta de Mn, Zn, Fe e Mg em melado e melaço de cana utilizando a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)**. Guarapuava, 2016. 90f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, Paraná, 2016.
- ANDRADE, C.K. de. **Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica para a determinação direta de Pb, Cd e Cr em amostras de mel utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite**. Guarapuava, 2013. 111f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2013.
- ANDRADE, C.K. de; ANJOS, V. E. dos A.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.; QUINÁIA, S. P. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 146, p. 166-173, 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Validação de métodos analíticos**. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Normas técnicas especiais**. Resolução CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. n. 12. 1978.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224-2234, 2009.
- BADER, N. R. Sample preparation for flame atomic absorption spectroscopy: an overview, **Rasayan J. Chem.**, v. 4, n. 1, p. 49-55, 2011.

BAJ, T.; BARYLUK, A.; SIENIAWSKA, E. Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p.52-61, 2018.

BAKKALI, K.; MARTOS, N. R.; SOUHAIL, B.; BALLESTEROS, E. Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 590–594, 2009.

BASU, T. K.; DICKERSON, J. W. **Vitamins in human health and disease**. Wallingford: CAB International, 1996.

BEZERRA, M. A.; CASTRO, J. T.; MACEDO, R. S.; SILVA, D. G. Use of constrained mixture design for optimization of method for determination of zinc and manganese in tea leaves employing slurry sampling. **Analytica Chimica Acta**, v. 670, p. 33–38, 2010.

BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P. dos.; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; ALVES, J. P. S. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941-959, 2019.

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. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal da Bahia, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 360 de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de dezembro de 2003.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. de A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Ecotoxicologia e Meio ambiente**, v. 13, p. 130-146, 2003.

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

CAMINI, A.; HOEHNE, L. Avaliação da decomposição por micro-ondas e posterior determinação de cálcio por ICP-OES e FAAS em amostras de mortadela e carne mecanicamente separada. **Revista da Unifebe**, n.14, p. 9-23, 2014.

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.

CARVALHO, R.F. **Beneficiamento dos derivados da cana de açúcar (melado e açúcar mascavo)**. Dossiê Técnico. Rede de Tecnologia da Bahia, 2007. 21p.

CAVECCI, B.; PADILHA P. M.; NEVES, R. C. F. Utilização da Extração Assistida por Ultrassom na Determinação da Disponibilidade de Nutrientes Inorgânicos em Rações Utilizadas na Dieta de Juvenis de Tilápia do Nilo. **Biblioteca Virtual FAPESP**, 2008.

CHAGAS, J. O.; CORRÊA, S.; ALMEIDA, A. M. de. Uso de sistema ternário homogêneo de solventes e espectrofotometria UV-VIS no desenvolvimento de método para a determinação de cobre em amostras de açúcar. **Conexão ci.: r. cient. UNIFOR-MG**, Formiga, v. 9, n. 1, p. 59-73, 2014.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p.540-560, 2017.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles, **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 8615–8627, 2012.

COBAYASHI, F. Cálcio: seu papel na nutrição e saúde. **Compacta Nutr.**, v.2, p. 3-18, 2004.

COSTA, V.; SILVA, E. G. P.; LIMA, D. C.; FRANCO, M.; JESUS, R. M.; BEZERRA, M. A.; AMORIM, F. A. C. 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**, p.1189-1198, 2018.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, n.4, p.214-219, 1980.

DEZOTTI, M. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos**. Rio de Janeiro: E-papers, 2008.

DIAS, F. de S.; ALVES, L. S.; SANTOS, W. N. L. dos.; BRUNS, R. E.; BEZERRA, M. A. Mixture Design Optimization of an Analytical Procedure for Iron Extraction and Determination from Cassava Leaves by Slurry Sampling Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Spectroscopy Letters**, v. 44, n. 6, p.388-392, 2011.

ELIN, R. J. Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy. **Magnes Res**, v. 23, n. 4, p. 194-98, 2010.

FAVA, A. R. **Atletas ingerem garapa para repor energia**. Jornal da Unicamp, edição 250, de 3 a 9 de maio de 2004.

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

FERREIRA, S. L. C.; MIRÓ, M.; SILVA, E. G. P.; MATOS, G. D.; REIS, P. S.; BRANDAO, G. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; DUARTE, A. T.; VALE, M. G. R.; ARAUJO, R. G. O. Slurry sampling - an analytical strategy for the determination of metals and metalloids by Spectro analytical techniques. **Appl. Spectrosc. Rev.** v. 45, n. 1, p. 44-62, 2010.

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, 2005.

FRANCISCO, B. B. A.; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Determination of metals in soft drinks packed in different materials by ETAAS. **Food Chemistry**, v. 185, p.488-494, 2015.

GALANAKIS, C. M. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: a viewpoint of opportunities and challenges, **Food Bioprod. Process**, v. 91, p. 575–579, 2013.

GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 38, 232–242, 2003.

GÓMEZ-NIETO, B.; GISMERA, M. J.; SEVILLA, M. T.; PROCOPIO, J. R. Fast sequential multi-element determination of major and minor elements in environmental samples and drinking waters by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 854, p. 13–19, 2015.

GUÉGUEN, L.; POINTILLART, A. The Bioavailability of Dietary Calcium. **J Am Coll Nutr.**, v. 19, n. 2, p. 119-36, 2000.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. New York: LTC, 2006.

HONIG, P. The presence of phosphate in cane juice. In: Congress of the international society of sugarcane technologists, 10, Hawaii, 1960. **Proceedings**. Amsterdam: Elsevier, 1960, p. 351-61.

HOSSAIN, M. B.; BRUNTON, N. P.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; O'DONELL, C. P. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana L.*) using response surface methodology, **Ultrason. Sonochem.**, v. 19, p. 582–590, 2012.

ICH. International Conference on Harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2 (R1)**. ICH Harmonized Tripartite Guideline: London, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 07 de julho de 2018.

JIN, Q.; LIANG, F.; ZHANG, H.; ZHAO, L.; HUAN, Y.; SONG, D. Application of microwave techniques in analytical chemistry, **TrAC Trends in Analytical Chemistry.**, v. 18, n. 7, p. 479 – 84, 1999.

KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; ARAIN, M. B.; AFRIDI, H. I.; JALBANI, N.; SARFRAZA, R. A.; ANSARI, R. Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2-3, p. 1391–1398, 2009.

KLEIN, A. L.; BRESCIANI, L.; OLIVEIRA, E. C. Características físico-químicas de biscoitos comerciais do tipo cookies adquiridos no vale do Taquari. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 7, n. 4, p. 167 – 73, 2015.

KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S. Algumas Aplicações Analíticas dos Ultrassons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 96, p. 51-6, 2005. KORNDORFER, G. H. Fertilizantes fosfatados sólidos e fluidos na cana-de-açúcar. Piracicaba, 1990. 91f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1990.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**, 1ª ed., Piracicaba, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: SARVIER, 2002.

LIANFU, Z.; ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, **Ultrason. Sonochem.**, v. 15, p. 731–737, 2008.

LOBO, A. S.; TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da Suplementação e da Fortificação de Alimentos sobre a Biodisponibilidade de Minerais. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 107-113, 2004.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; VIÑAS, P.; ROMERO-ROMERO, R.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Fast determination of phosphorus in honey, milk and infant formulas by electrothermal atomic absorption spectrometry using a slurry sampling procedure. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 1, 48–55, 2007.

MACHADO, I.; BERGMANN, G.; PISTÓN, M. 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. 373-76, 2016.

MARCHEAFAVE, G. G.; TORMENA, C. D.; PAULI, E. D.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. **Microchemical Journal**, v. 146, p.713-721, 2019.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1999.

MEIRA, L. A.; DIAS, F. de S. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 130, p.56-63, 2017.

MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; MCBEAN. The Importance of Meeting Calcium Needs with Foods. **J Am Coll Nutr.**, v. 20, n. 2, p. 168-85, 2001.

MIRANDA, L.; FELSNER, M.L.; TORRES, Y.R.; HOSS, I.; GALLI, A.; QUINÁIA, S.P. Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. **Química Nova**, v.38, p.419-426, 2015.

MORAES, P. M.; LOUREIRO, V. R.; PADILHA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SALEH, M. A. D.; SANTOS, F. A.; SILVA, F. A. Determinação de Fósforo Biodisponível em Rações de Peixes Utilizando Extração Assistida por Ultrassom e Espectrofotometria no Visível. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 923-927, 2009.

MOREIRA, G. C.; DIAS, F. S. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. **Microchemical Journal**, v. 141, p.247-252, 2018.

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). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 344-348, 1999.

MRMOSANIN, J. M.; PAVLOVICA, A. N.; KRSTICA, J. N.; MITICA, S. S.; TOSICA, S. B.; STOJKOVICA, M. B.; MICICB, R. J.; DORDEVICA, M. S. Multielement quantification in dark chocolate by ICP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p.163-171, 2018.

MULLAPUDI, V. B. K.; CHANDRASEKARAN, K.; VENKATESWARLU, G.; KARUNASAGAR, D. Development of a simple and rapid microwave-assisted extraction method using very dilute solutions of perchloric acid and hydrogen peroxide for the multi-elemental analysis of food materials by ICP-OES: A green analytical method. **Microchemical Journal**, v. 146, p.807-817, 2019.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 4. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 856 p.

NAOZUKA, J.; VIEIRA, E.; CARVALHO, NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, 1667–1672, 2011.

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

NILSON, E. A. F.; JAIME, P. C.; RESENDE, D. O. Iniciativas Desenvolvidas no Brasil para a Redução do Teor de Sódio em Alimentos Processados. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 32, n. 4, p. 287-292, 2012.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media, **Spectrochim. Acta Part B**, v. 61, n. 5, p. 465 – 95, 2006.

NOGUEIRA, F. dos S.; FERREIRA, K. S.; CARNEIRO JUNIOR, J. de B.; PASSONI, L. C. Minerais em melados e em caldos de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, p.727-731, 2009.

NOVAES, C. G.; BEZERRA, M. A.; SILVA, E. G. P. da.; SANTOS, A. M. P. dos.; ROMÃO, I. L. S., SANTOS NETO, J. H. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), **Microchem. J.**, v. 128, p. 331–346, 2016.

NUNES, L. S.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; LEMOS, V. A.; DOS SANTOS, W. N. L.; KORN, M. G. A.; TEIXEIRA, L. S. G. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 780–783, 2011.

Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentos – NEPA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. Versão II. 2 ed. Campinas, SP: UNICAMP, 2006. 113 p.

OLIVEIRA, S. R.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. Determination of macro and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 4, p. 316–320, 2010.

PAN, Z.; QU, W.; MA, H.; ATUNGULU, G. G.; MCHUGH, T. H. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 1249–1257, 2011.

PEREIRA, G. A. P.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo, **Rev Bras Reumatol**, v. 49, n. 2, p.164-80, 2009.

PERONICO, V. C. D. **Desenvolvimento de Procedimentos para o Preparo de Amostra na Determinação de Macro e Micronutrientes em Plantas Oleaginosas por Espectrometria de Absorção Atômica**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS, 2014.

PERONICO, V. C. D.; RAPOSO Jr, 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. 1287-92, 2016.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A. S.; BOURVELLEC, C. L.; RENARD, C M. G. C.; CHEMAT, F. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace, **J. Food Eng.**, v. 111, p. 73–81, 2012.

PINGRET, F. D.; FABIANO-TIXIER, A. S.; CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction. In J. P. M. Rostagno (Ed.), **Natural product extraction: Principles and applications** (p. 89–112). Cambridge (UK): RSC Publishing, 2013.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometry's. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 117–128, 2009.

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

RIBEIRO, F. A. L.; CASTRO FERREIRA, M. M.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; SALGADO, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CORTÉS, S. Assessment of minerals in aged grape marc distillates by FAAS/FAES and ICP–MS. Characterization and safety evaluation. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 49–55, 2014.

SANTELLI, R.; BEZERRA, M. A.; SANTANA, O. D.; CASSELLA, R. J.; FERREIRA, S. L. C. Multivariate technique for optimization of digestion procedure by focused microwave system for determination of Mn, Zn and Fe in food samples using FAAS. **Talanta**, v. 68, n. 4, p.1083-1088, 2006.

SARIS, N. L.; MERVAALA, E.; KARPPANEN, H.; KHAWAJA, J. A.; LEWENSTAM A. Magnesium: an update on physiological, clinical, and analytical aspects. **Clin Chem Acta**, v. 294, n. 1-2, p. 1-26, 2000.

SARNO, F.; CLARO, R. M.; LEVY, R. B.; BANDONI, D. H.; MONTEIRO, C. A. Estimativa de Consumo de Sódio pela População Brasileira, 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 571-578, 2013.

SETYANINGSIH, W.; DUROS, E.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of melatonin from red rice (*Oryza sativa*) grains through a response surface methodology. **Applied Acoustics**, v. 103, p. 129–135, 2016.

SETYANINGSIH, W.; SAPUTRO, I. E.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Optimization and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. **Food Chemistry**, v. 169, p.141-149, 2015.

SEVERO, J. S. Metabolic and Nutritional Aspects of Magnesium. **Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria**, n. 35, p.67-74, 2015.

SILVA, F. A.; NEVES, R. C. F.; QUINTERO-PINTO, L. G.; PADILHA, C. C. F.; JORGE, S. M. A.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; PADILHA, P. M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1542-7, 2007.

SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 1025-30, 2006.

SILVA, F. C.; CESAR, M. A. A.; SILVA, C. A. B. **PEQUENAS INDUSTRIAS RURAIS DA CANA-DE-AÇÚCAR: Melado, Rapadura e Açúcar Mascavo**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2003. 155 p.

SILVA, M. M. P. da. **Caracterização da produção e avaliações de indicadores de qualidade tecnológicas de amostras de melado de estado de São Paulo**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de São Carlos, 2012.

SILVA, B. da.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Simplex-centroid design and Derringer's desirability function approach for simultaneous separation of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys by HPLC/DAD. **Journal Of Chromatography A**, v. 1585, p.182-191, 2019.

SILVA, D. dos S.; SANTOS, C. S. dos; PANDO, L. A.; GOMES, S. R.; NOVAES, C. G.; SANTOS, W. N. L. dos; BEZERRA, M. A. Doehlert design in the optimization of

ultrasound assisted dissolution of fish fillet samples with tetramethyl ammonium hydroxide for metals determination using FAAS. **Food Chemistry**, v. 273, p.71-76, 2019.

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

SOUSA, R. A.; LISBOA, T. P. Determinação de Fe e Zn em queijos Petit Suisse: aspectos analíticos e teores encontrados em amostras comerciais. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 1, p. 35-43, 2015.

SNEDDON, E. J.; HARDAWAY, C. J.; SNEDDON, J.; BOGGAVARAPU, K.; TATE, A. S.; TIDWELL, S. L.; GARY, D. P.; DOUVRIS, C. Determination of selected metals in rice and cereal by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). **Microchemical Journal**, v. 134, p.9-12, 2017.

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.

SOYLAK, M.; TUZEN, M.; SOUZA, A. S.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, S. L. C. Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in 13 tea samples employing flame atomic absorption spectrometry, **J. Hazard. Mater.**, v. 149, p. 264–268, 2007.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, 1956–1961, 2013.

TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Química Analítica de Processos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 5, São Paulo, 2006.

TUZEN, M.; ULUOZLU, O. D.; MENDIL, D.; SOYLAK, M.; MACHADO, L. O. R.; SANTOS, W. N. L. dos; FERREIRA, S. L. C. A simple, rapid and green ultrasound assisted and ionic liquid dispersive microextraction procedure for the determination of tin in foods employing ETAAS. **Food Chemistry**, v. 245, p.380-384, 2018.

USP. United States Pharmacopeia Convention; **Pharmacopeia 24**, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, 2005.

VITTI, G. D. et al. **Nutrição e Adubação da Cana-de-açúcar**. Bebedouro - SP, 2005. p. 15-18.

VOLPE, S. L. Magnesium in disease prevention and overall health. **Adv Nutr**, v.4, n. 3, p. 378–83, 2013.

WANG, B.; CHANG L.; KANG, Z.; CHU, H.; TAI, H.; HUANG, M. Inhibitory effects of molasses on mutation and nitric oxide production. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p.1102-1107, 2011.

CAPÍTULO 3. METODOLOGIA

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Um espectrômetro de absorção atômica com chama (F AAS) da Varian modelo AA 220, equipado com queimadores de ar/acetileno e de acetileno/óxido nitroso, foi utilizado para fazer a leitura das absorbâncias dos metais de interesse. Como fonte de luz, utilizaram-se lâmpadas de cátodo oco (Varian, Analítica e Agilent) a 279,5 nm para o Mn operando com corrente de 15 mA, 285,2 nm para o Mg operando com corrente de 4 mA, 422,7 nm para o Ca operando com corrente de 10 mA e 248,5 nm para o Fe operando com corrente de 5 mA, respectivamente. O fluxo de acetileno foi de 1,50 L min⁻¹, o fluxo de ar de 3,5 L min⁻¹ e o fluxo de óxido nitroso de 2,8 L min⁻¹.

A leitura das absorbâncias para o P foi realizada em um espectrofotômetro UV-VIS Spectrum modelo SP-2000 UV, com a radiação visível fixada em 420 nm. Os espectros para o P foram obtidos em um espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu modelo UV-1280, com faixa de comprimentos de onda de 190 a 1100 nm.

O procedimento de preparação das amostras envolvendo a extração assistida por ultrassom dos elementos foi conduzido em um banho ultrassônico Elmasonic P-30H, com capacidade de 2,8 L. As massas das amostras foram obtidas pela pesagem em uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D, com precisão de $\pm 0,0001$ g. Para o procedimento foram utilizadas ainda micropipetas Modelo Labmate-HTL com diferentes capacidades de volumes. A digestão assistida por micro-ondas (método de referência) foi realizada em um sistema de digestão por micro-ondas Anton Paar Multiwave GO, rotor 12HVT50, equipado com 12 frascos com capacidade de 50 mL. As condições máximas alcançadas pelo equipamento foram de temperatura de 180 °C (com sistema de resfriamento a 70 °C) e pressão de 20 bar.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Água ultrapura (18,2 M Ω cm⁻¹) de um sistema Milli-Q[®] (Millipore Corporation, USA) foi usada no preparo das soluções. De modo a evitar, possíveis contaminações das soluções e das amostras, foram utilizados procedimentos de técnicas limpas, em que as vidrarias foram mantidas em uma solução de ácido nítrico (5,0 %, v/v) durante 24 horas para a descontaminação e posteriormente enxaguadas com água ultrapura.

Padrões metálicos de Fe, Mn, Mg e Ca (1000 (mg L⁻¹) da SpecSol foram utilizados para todos os ensaios. Soluções padrão de trabalho dos metais, com diferentes concentrações foram preparadas a partir de diluições da solução padrão estoque. Para o P foi preparada uma solução padrão de fosfato diluída a partir de uma solução estoque, em que 1,0 mL desta solução correspondia a 0,2 mg de P₂O₅.

Ácido nítrico (HNO₃, (65 %, m/v), Sigma-Aldrich) e ácido clorídrico (HCl, (37 %, m/v), F-Maia) foram usados para a extração e/ou digestão das amostras.

3.3 AMOSTRAGEM

As amostras de melado de cana foram adquiridas em supermercados e outros estabelecimentos comerciais, sendo estas provenientes de diferentes fabricantes e regiões do Brasil. Essas amostras foram armazenadas em suas embalagens de origem em um local arejado e seco até a realização dos ensaios, devidamente identificadas com a codificação M (Melado) seguida de numeração arábica. Para a realização do estudo de otimização foi utilizada a amostra de melado de cana identificada como M 31 devido a mesma apresentar interferentes que dificultavam sua otimização, como coloração escura e alta viscosidade.

Na Tabela 1 são descritas as informações das amostras de melado de cana utilizadas neste estudo, tais como codificação adotada, procedência, data de fabricação e/ou validade e o número do lote (quando informado pelo fabricante).

TABELA 1 - INFORMAÇÕES E CODIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MELADO DE CANA UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO.

Amostras	Data de Fabricação	Data de Validade	Fabricante	Lote	Procedência
M01	05/2015	05/2016	A	505	Cascavel-PR
M02	-	08/2015	B	LH1401	Santo Antônio da Patrulha-RS
M03	-	02/2017	C	200215	Treza Tílias-SC
M04	06/2015	06/2017	D	445	Benedito Novo-SC
M05	-	07/2018	E	15.G.02	Blumenau-SC
M06	09/2015	09/2016	F	1109	Caibi-SC
M08	-	02/2019	H	7083008	Tijucas-SC
M09	-	01/2017	I	24/01	Santo Antônio da Patrulha-RS
M11	-	02/2016	K	9604	Itupeva-SP
M12	-	09/2018	I	33/17	Uberaba-MG
M13	08/2015	08/2016	L	-	Brusque-SC
M14	-	05/2018	B	LE1722	Santo Antônio da Patrulha-RS
M15^a	07/2015	07/2016	I	-	Santo Antônio da Patrulha-RS
M16^a	08/2013	08/2014	M	-	Santo Antônio da Patrulha-RS
M17	-	10/2016	N	28115	Imaruí-SC
M19	09/2014	09/2015	A	455	Cascavel-PR
M20	04/2017	04/2018	P	10	Assaí-PR
M21	09/2015	09/2016	Q	-	Quissamã-RJ
M22	-	08/2016	R	642	Capitão L. Marques-PR
M24	-	10/2016	T	211015	Santo Antônio da Patrulha-RS
M25	07/2017	07/2018	L	-	Brusque-SC
M27^a	12/2017	08/2018	V	-	Estrela-RS
M28	-	10/2018	W	-	Feira de Santana-BA
M29	11/2017	11/2018	X	9	Amparo-SP
M30^a	-	11/2018	Y	-	Campina das Missões-RS
M31	08/2017	08/2019	Z	25/08/17A	Itupeva-SP

^a As amostras 15, 16, 18, 27 e 30 correspondem a melado batido e as demais a melado de cana em sua formulação líquida.

3.4 DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Para o procedimento de digestão assistida por micro-ondas foi utilizada uma massa de 1,0 g das amostras de melado de cana (base úmida). A esta massa, foram adicionados 5,0 mL de ácido nítrico concentrado e 1,0 mL de água ultrapura. Esta solução foi preparada em tubos de Teflon[®] (PTFE) e mantida em um sistema de digestão assistida por micro-ondas durante 40 minutos. Após o resfriamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico e diluída para um volume final de 25,0 mL com água ultrapura. Os metais em estudo foram determinados por espectrometria de

absorção atômica com chama (F AAS) e espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS, em que as concentrações foram expressas em mg g^{-1} . Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.5 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU)

Para a extração assistida por ultrassom pesou-se 0,5 g das amostras de melado de cana (base úmida) diretamente em um tubo de centrifugação tipo *Falcon*, em polipropileno, de 15,0 mL. Posteriormente, foram adicionados diferentes volumes de cada solução extratora (HCl, HNO₃ e H₂O), obtendo-se um volume final de 5,0 mL de acordo com os valores otimizados para cada metal no planejamento de misturas descrito no item 3.6.

Em seguida, foi realizada uma homogeneização da amostra com leve agitação. Os tubos foram mantidos fechados em todo o processo de extração. Posteriormente, os tubos com as amostras foram imersos no banho ultrassônico até cobertura total da amostra com o auxílio de um suporte de papelão, que mantinha os tubos fixos na região de maior intensidade de cavitação (centro do banho ultrassônico), permanecendo sob sonicação por 10 minutos. A energia ultrassônica utilizada foi de 37 kHz, com potência de 100 W e temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C). Após a sonicação, a amostra foi transferida para balões volumétricos de 10,0 mL e avolumada com água ultrapura. O mesmo procedimento foi aplicado para os brancos de cada experimento. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.

3.6 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR POR UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS

A otimização do reagente extrator para Fe, Mn, Mg, Ca e P, utilizando a extração assistida por ultrassom foi conduzida a partir de um planejamento de misturas do tipo Simplex Centróide. Neste estudo, foram avaliados como reagentes extratores o ácido nítrico (HNO₃), o ácido clorídrico (HCl) e a água. A Tabela 2 apresenta a composição dos reagentes utilizados para o planejamento de misturas. Para todos os ensaios foi fixada uma massa de 0,5 g de amostra com volume final de solvente extrator de 5,0 mL. As condições de sonicação foram mantidas constantes: frequência de 37 kHz, potência de 100 W, temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) e tempo de 10 minutos,

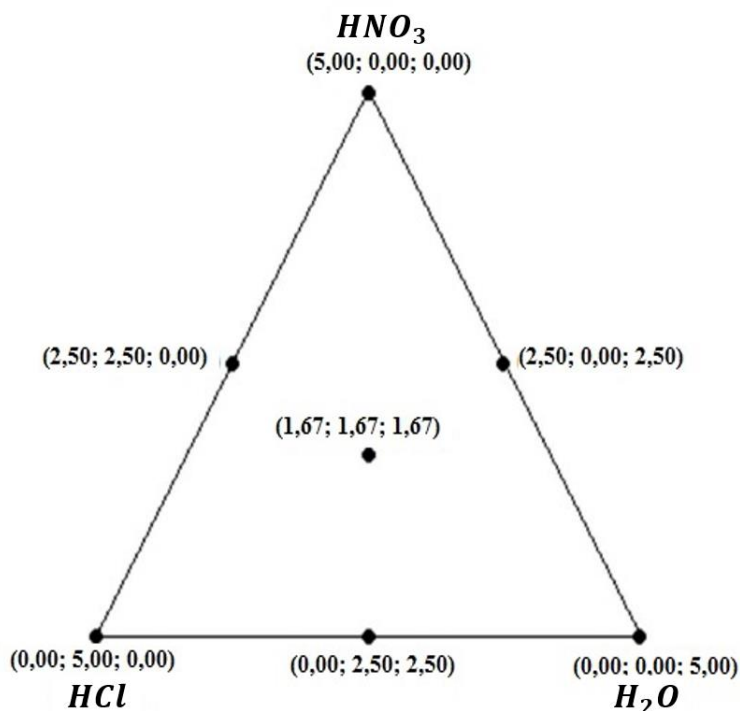
bem como a posição dos tubos, próxima ao centro do banho ultrassônico (fixada por meio de um suporte de papelão).

TABELA 2 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS PARA A DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR.

<i>Ensaio</i>	Composição do Solvente Extrator (mL)		
	<i>HNO₃</i>	<i>HCl</i>	<i>H₂O</i>
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	1,67	1,67	1,67

A aplicação deste planejamento permitiu a avaliação da eficiência de extração dos solventes: ácido nítrico (HNO_3), ácido clorídrico (HCl) e água com diferentes proporções, em misturas binárias (proporções iguais de dois solventes) e na mistura ternária (ponto central). A Figura 1 mostra a matriz do planejamento de misturas utilizado na otimização dos solventes de extração de metais em melado de cana por EAU.

FIGURA 1 – ILUSTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX CENTROIDE APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR PARA A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE MINERAIS EM MELADO DE CANA.



FONTE: O autor (2018).

Nesse estudo foram realizadas quatro réplicas do ponto central para avaliar o erro experimental para o planejamento de misturas aplicado aos metais Fe e Mn e ao P. Para Ca e Mg, além da realização de cinco réplicas no ponto central, também foram realizadas réplicas em todos os pontos do planejamento (componentes puros e misturas binárias). Posteriormente, para a determinação das condições ótimas de solvente extrator para Fe, Mn, Ca, Mg e P foi usada a porcentagem de extração para cada elemento. Esta considera como valor de referência os teores obtidos pela digestão assistida por micro-ondas da amostra de melado de cana. As taxas de extração foram calculadas de acordo com a Equação 3:

$$\text{Extração (\%)} = \frac{C_{EAU}}{C_{DM}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que C_{EAU} é a concentração dos metais determinada após a extração assistida por ultrassom, dada em mg g^{-1} ; C_{DM} é a concentração dos metais obtida após a digestão assistida por micro-ondas, também dada em mg g^{-1} . Todas as análises estatísticas dos

dados foram realizadas pelo software *Minitab for Windows versão 16.2.2* (MINITAB Incorporation, USA, 2010).

No que diz respeito, aos modelos estatísticos gerados (linear, quadrático e cúbico especial) a partir das taxas de extrações dos metais e do P, estes foram ajustados visando produzir o mínimo possível de resíduos. A análise de variância (ANOVA) da técnica de regressão linear foi realizada para testar a falta de ajuste e a significância do modelo ajustado, em um nível de confiança de 95%. Também foram avaliados parâmetros da regressão como valores de F de regressão ($F_{regressão}$) e de F de falta de ajuste (F_{faj}), valores de p , coeficientes de determinação (R^2 e $R^2_{ajustado}$), a raiz quadrada do quadrado médio do resíduo do modelo correspondente e os gráficos de resíduos, assim como, gráficos de contorno para as misturas (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016).

3.7 DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Ca E Mg POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AAS)

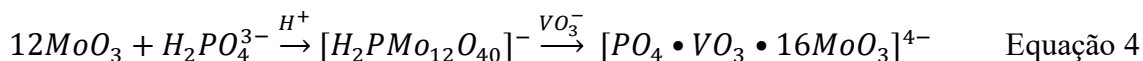
Após a extração assistida por ultrassom, as amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com água ultrapura, com posterior determinação de Fe, Mn, Ca e Mg por F AAS. Os intervalos lineares estabelecidos para cada metal foram de 0,4 – 2,0 mg L⁻¹ para o Fe, 0,2 – 1,0 mg L⁻¹ para o Mn, 0,4 – 2,0 mg L⁻¹ para o Ca e 0,1 – 0,8 mg L⁻¹ para o Mg.

Entretanto, como algumas amostras analisadas apresentaram concentrações variadas dos metais de interesse e para assegurar a obtenção de concentrações das amostras dentro da faixa linear de trabalho foram realizadas diluições das mesmas, quando necessário.

3.8 DETERMINAÇÃO DE P POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO UV-VIS

Para a determinação de P foi adotado o método espectrofotométrico do ácido vanadomolibdofosfórico. De acordo com Moraes, Loureiro e Padilha (2009), a complexação do fósforo ocorre em meio ácido por meio da reação dos íons ortofosfato com íons molibdato e vanadato, com posterior formação de um heteropoliácido, que é um complexo de cor amarela. Este complexo irá absorver radiação na faixa visível de

420 nm, que é o comprimento de onda complementar à cor verde/amarela. A reação de complexação do P com os íons molibdato-vanadato, descrita por Patnaik (2010), é apresentada a seguir:



Para o preparo das soluções foi retirada uma alíquota de 1,0 mL da solução da extração ou da solução da digestão, descritas nos itens 3.4 e 3.5, respectivamente e, em seguida esta foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL, no qual posteriormente foi adicionado 2,50 mL do agente complexante de vanadomolibdato. Em seguida, o volume do balão foi completado com água ultrapura. Transcorridos 10 minutos para o complexo reagir com a amostra foi realizada a leitura do teor de P expresso como P₂O₅ no espectrofotômetro em 420 nm, de tal modo, que a absorbância estivesse compreendida na faixa linear da curva analítica (0,2 – 1,8 mg P₂O₅). O procedimento foi baseado no método 031/IV descrito nos Métodos Físico-Químicos para a Análise de Alimentos (IAL, 2008).

A intensidade de radiação absorvida pelo complexo foi proporcional à quantidade de pentóxido de fósforo (P₂O₅) presente na amostra. Em vista disso, a quantidade de fósforo foi determinada a partir do cálculo de concentração para o P₂O₅. Os resultados foram comparados com os obtidos pelo método de referência (digestão assistida por micro-ondas) de acordo com a Equação 3 apresentada no item 3.6.

3.9 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A validação dos métodos de extração assistida por ultrassom, aplicados em amostras de melado de cana, foi realizada a partir da avaliação de algumas figuras de mérito como linearidade, limites de quantificação e de detecção, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão, de acordo com guias orientativos da AOAC, INMETRO, ICH, ANVISA e EURACHEM GUIDE e artigos na literatura (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2018; EURACHEM GUIDE, 2014; AOAC, 2012; ARAÚJO, 2009; RIBEIRO e FERREIRA, 2008; RIBANI et al., 2004). Todas as

análises estatísticas foram realizadas pelo software *Minitab for Windows versão 16.2.2* (MINITAB Incorporation, USA, 2010).

3.9.1 Curvas Analíticas e Linearidade

As curvas analíticas foram construídas a partir de diferentes métodos de padronização, sendo estes de padronização externa em meio aquoso (PE), de padronização externa em meio do solvente extrator (PE-MIS) e de padronização por adição de padrão (AP). O método de PE consistiu na dissolução dos padrões de Fe, Mn, Mg, Ca e P em solução aquosa, enquanto que para o método de PE-MIS os padrões dos metais Fe, Mn, Mg e Ca e do P foram dissolvidos nos solventes extratores determinados pela condição otimizada pelo planejamento de misturas; já para o método de AP, os padrões dos metais e do P foram adicionados à matriz da amostra de melado de cana com conseguinte diluição em água ultrapura (1:10, m/v), com posterior processo de sonicação em banho ultrassônico. As curvas de PE-MIS e AP foram construídas para avaliar possíveis interferências do solvente e/ou da matriz de melado de cana. As amostras utilizadas nesse estudo foram àquelas identificadas como M 08, M 14, M 25, M 28 e M 29.

As curvas analíticas foram construídas com cinco pontos em diferentes faixas de trabalho, de acordo com a concentração de cada elemento (Tabela 3) na amostra de melado. Todos os pontos foram analisados em duplicata (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2018; ARAÚJO, 2009).

TABELA 3 - FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADAS NAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Ca, Mg E P.

Elemento	Faixa de concentração (mg L⁻¹)
<i>Fe</i>	0,4 – 2,0
<i>Mn</i>	0,2 – 1,0
<i>Ca</i>	0,4 – 2,0
<i>Mg</i>	0,1 – 0,8
<i>P</i>	0,2 – 1,8

A linearidade das curvas analíticas foi verificada pela aplicação da técnica de regressão linear simples e pela aplicação do teste de falta de ajuste em um intervalo de confiança de 95 % (ARAÚJO, 2009; BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2002).

3.9.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos a partir de 10 medidas do branco analítico das curvas analíticas de padrão externo em meio aquoso (PE), conforme as equações 5 e 6, em que s o é desvio padrão dos brancos e b o coeficiente angular da curva analítica (NATA, 2018; ANVISA, 2017).

$$LD = 3 \times \frac{s}{b} \quad \text{Equação 5}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad \text{Equação 6}$$

3.9.3 Precisão

Este parâmetro foi avaliado pela análise de estimativas de repetitividade e precisão intermediária, expressas pelos desvios padrão relativos (DPR %), e pelo valor Horrat. Para a avaliação da precisão as amostras descritas no item 4.9.1 foram analisadas em triplicatas durante cinco dias consecutivos. Os desvios padrão relativos (DPR %) foram calculados a partir da Equação 7, em que s é o desvio padrão e \bar{x} o valor médio das medidas. A adequabilidade da precisão intermediária foi avaliada pelo valor Horrat, de acordo com a Equação 8.

$$DRP (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

$$Horrat = \frac{DRP_{\text{precisão intermediária}}}{DRP_{\text{Horwitz}}} \quad \text{Equação 8}$$

$$DRP_{\text{Horwitz}} = 2C^{-0,15}$$

3.9.4 Exatidão

A exatidão do método de extração foi avaliada por meio da comparação entre o método de referência (digestão assistida por micro-ondas) e os métodos de extração assistida por ultrassom. Foram analisadas as cinco amostras descritas no item 3.9.1, em duplicata, a partir da aplicação de um *teste-t* pareado em um nível de 95 % de confiança.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Validação de métodos analíticos**. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Métodos de Análise Oficiais da AOAC**. Apêndice F. Washington, 2012.

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

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp. 2002.

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.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed. São Paulo, v. 1, 1020 p, 2008.

ICH. International Conference on Harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2 (R1)**. ICH Harmonize Tripartite Guideline: London, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 07 de julho de 2018.

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

MORAES, P. M.; LOUREIRO, V. R.; PADILHA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SALEH, M. A. D.; SANTOS, F. A.; SILVA, F. A. Determinação de Fósforo Biodisponível em Rações de Peixes Utilizando Extração Assistida por Ultrassom e Espectrofotometria no Visível. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 923-927, 2009.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 4. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 856 p.

NATA. **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**, 2018, 31p.

PATNAIK, P. Analytical Techniques: Colorimetric Analysis. In: PATNAIK, P. **Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Solid Wastes**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 65-69.

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

RIBEIRO, F. A. L.; CASTRO FERREIRA, M. M.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

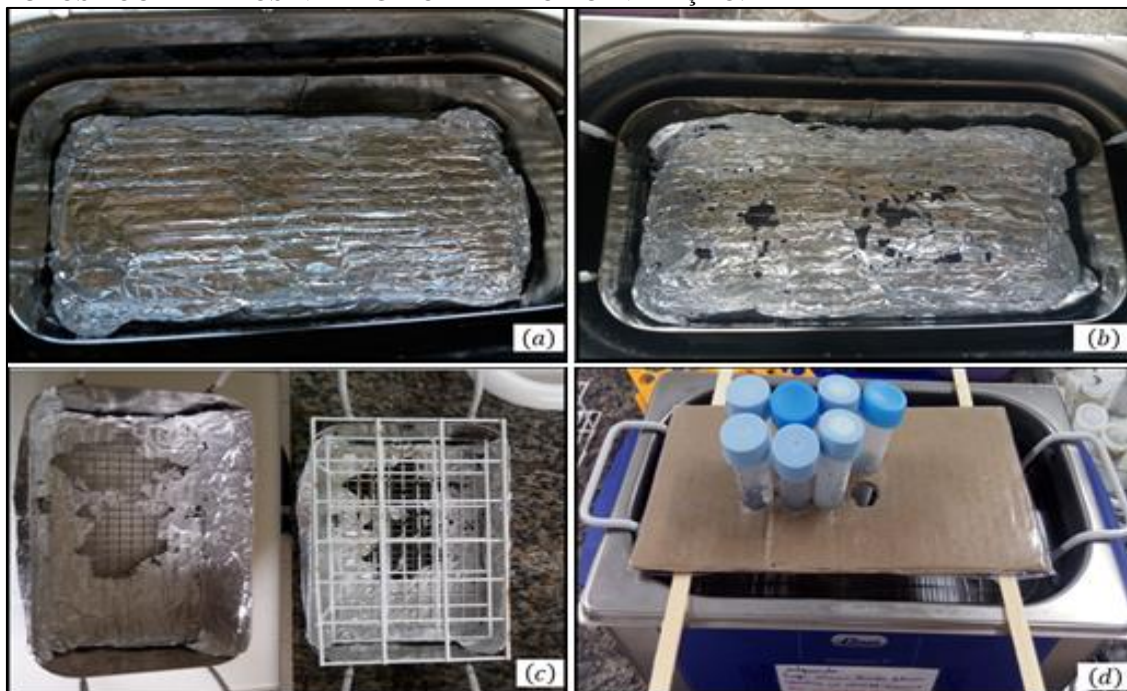
CAPÍTULO 4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Para a realização das extrações assistidas por ultrassom, alguns parâmetros experimentais foram avaliados com o intuito de melhorar sua eficiência como: o efeito da cavitação dentro do banho ultrassônico, a massa da amostra, a temperatura, a natureza, a concentração e o volume do solvente extrator.

A identificação do ponto de maior intensidade de cavitação do banho ultrassônico foi realizada pelo método de erosão do papel alumínio descrito por Peronico (2014). Este teste consiste em cobrir o fundo da cuba do banho de ultrassom com papel alumínio, com posterior adição de água, e com sonicação de um a cinco minutos. A área que apresentar maior intensidade de cavitação será apontada pelas perfurações no papel alumínio, indicando o local onde devem ser inseridos os tubos no banho ultrassônico. A partir disso, a inserção dos tubos no banho ultrassônico foi realizada por meio de um aparato que mantivesse os tubos concentrados nessa região. O sistema utilizado é apresentado na Figura 2.

FIGURA 2 - TESTE DE EROSIÃO DO PAPEL ALUMÍNIO PARA IDENTIFICAÇÃO DA REGIÃO DE MAIOR CAVITAÇÃO NO BANHO DE ULTRASSOM. (a) PAPEL ALUMÍNIO ANTES DO TESTE, (b) APÓS 1 MINUTO, (c) APÓS 5 MINUTOS E (d) SUPORTE DE PAPELÃO COM OS TUBOS LOCALIZADOS NA REGIÃO DE MAIOR CAVITAÇÃO.



FONTE: O autor (2018).

O sistema apresentou três regiões equivalentes de maior intensidade de cavitação próximas ao centro do banho ultrassônico (Figura 2c), sendo então, esta região escolhida para a inserção dos tubos no banho de ultrassom. A mesma incidência foi verificada nos estudos de Peronico (2014) e Soriano (2006), corroborando com os resultados deste trabalho.

Geralmente, a natureza (complexante ou oxidante) e a concentração do reagente extrator, assim como, o tempo de sonicação, são as variáveis que possuem uma maior influência nas extrações de espécies inorgânicas (FILGUEIRAS et al., 2000; NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; PERONICO e RAPOSO Jr., 2016). Sendo assim, estudos univariados foram realizados para avaliar a influência, na extração de metais, de fatores como razão massa/volume, tempo de sonicação e temperatura de sonicação. A natureza e o volume (5,0 mL do solvente extrator), a frequência (37 kHz) e a potência de sonicação (100 W) foram mantidos constantes na avaliação de cada um dos fatores já citados. Ressalta-se, que nessa etapa do trabalho os parâmetros experimentais foram avaliados individualmente (estudos univariados) devido aos mesmos não apresentarem uma resposta significativa entre si quando avaliados em conjunto (estudo multivariado).

Dessa maneira, a determinação da razão de massa de melado/volume dos reagentes extratores se baseou na razão sólido/solvente, já que a viscosidade da amostra demonstrou ter influência no processo de extração dos metais da matriz de melado de cana. Além disso, alguns metais como o Mn estão presentes em baixas concentrações na amostra. Em vista disso, torna-se fundamental encontrar uma razão de massa de melado/volume de solvente extrator que combine a máxima eficiência de sonicação com a mínima interferência da viscosidade da solução. De acordo com Arruda, Rodriguez e Arruda (2003), quando o meio reacional possui baixa viscosidade, a propagação das ondas ultrassônicas se torna mais efetiva para a extração de metais. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que quando a viscosidade da solução é alta, se torna difícil à indução do processo de cavitação, pois o número de microbolhas geradas no volume é reduzido (BERLAN e MASON, 1992). Com isso, e considerando as razões massa/volume avaliadas (1:5 a 1:50 g mL⁻¹) foi verificado que o rendimento das taxas de extração aumentava com a diminuição da razão sólido-líquido. Entretanto, visando minimizar o efeito da viscosidade/densidade da solução de melado no meio e permitir, ainda, a determinação de elementos em baixas concentrações como o Mn, a razão de massa/volume escolhida, para este estudo, foi de 1:10 g mL⁻¹.

No que diz respeito ao tempo de sonicação, foram avaliados intervalos de 10 a 40 minutos, sendo este, posteriormente, fixado em 10 minutos, pois foi observado que quanto maior o tempo de sonicação (intervalos superiores a 20 minutos), menores eram as taxas de extração obtidas para cada metal. Na literatura alguns estudos reportam que, em tempos mais longos de sonicação, o que resulta no aumento do contato do soluto com o solvente, ocorre a formação de diferentes espécies químicas que podem se recombinar em diferentes estruturas no líquido. Este comportamento da solução pode fazer com que haja perda do analito de interesse ou, ainda, que este fique ligado a complexantes na matriz (ARRUDA, RODRIGUEZ e ARRUDA, 2003; AL-DHABI, PONMURUGAN e JEGANATHAN, 2017). Além disso, tempos de sonicação mais curtos, se tornam viáveis do ponto de vista econômico, principalmente para processos de análises rotineiras (SAHIN e SAMLI, 2013). Em relação à temperatura, quando se avaliou o intervalo de 25,0 a 60,0 °C não foram verificadas alterações significativas nas taxas de extrações dos metais quando havia o aumento da mesma. Dessa maneira a temperatura foi mantida constante (temperatura ambiente, $25,0 \pm 2,00$ °C).

Após a verificação desses parâmetros, que garantiram uma maior eficiência de extração dos metais de interesse foram iniciados os estudos de otimização por planejamento de misturas, visando a determinação da composição do solvente extrator ótimo.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR POR PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE

Para o estudo de otimização foi empregado um planejamento de misturas do tipo simplex centróide que visa estabelecer as melhores proporções entre os componentes de uma mistura. Geralmente, para a extração de metais são utilizadas soluções ácidas como componentes dessas misturas, por apresentarem uma boa eficiência, na fase de extração (BARROS et al., 2013; PERONICO e RAPOSO Jr., 2016).

Na literatura, é observado que os métodos de preparo de amostra para a análise elementar, que fazem uso da extração assistida por ultrassom, são realizados, principalmente, em condições brandas, com o uso de ácidos diluídos, baixas pressões e em temperatura ambiente (KRUG, 2006; PRIEGO-CAPOTE e CASTRO, 2007; MANUTSEWEE et al., 2007; BARROS et al., 2013; COSTA et al., 2018). Porém, muitas vezes, a composição da matriz pode influenciar na definição desses parâmetros,

requerendo a utilização de reagentes concentrados (PRIEGO-CAPOTE e CASTRO, 2007).

A maioria dos métodos de otimização para extrações em amostras inorgânicas faz uso de uma mistura de dois ou três tipos de ácidos. Krug (2006) aponta em seus estudos que essas misturas são muito usadas devido aos ácidos apresentarem diferentes propriedades que podem ser combinadas (oxidantes e/ou complexantes). Além disso, pode ocorrer à formação de produtos de maior reatividade, como é o caso da mistura de ácido clorídrico e ácido nítrico. Contudo, para garantir a eficiência do solvente como reagente extrator, é necessário usar proporções adequadas desses extratores, o que também auxilia na melhora das características analíticas da metodologia (BARROS et al., 2013).

Com base nisso, o planejamento de misturas foi desenvolvido, de modo a estabelecer a composição ótima dos solventes extratores, sendo que estes variaram de 0,00 a 5,00 mL de ácido nítrico, de ácido clorídrico e de água, respectivamente. Na literatura, também são encontrados trabalhos que fazem uso de diferentes proporções de misturas de ácido nítrico e ácido clorídrico para a determinação de metais (HRISTOZOV et al., 2004; REZIC, 2009). Outros parâmetros da extração assistida por ultrassom tais como a frequência de sonicação, o tempo de sonicação, a posição dos frascos de extração dentro do banho ultrassônico e a temperatura foram mantidos constantes de acordo com as condições ótimas estabelecidas no item 4.1.

Após a preparação das amostras foram realizadas as leituras para Fe, Mn, Ca e Mg por FAAS e de P por espectrofotometria no UV-VIS, como descrito nos itens 3.7 e 3.8 (Capítulo 3). As taxas de extração, dadas em porcentagem, foram calculadas a partir da concentração dos metais determinada após o processo EAU em relação às concentrações obtidas pelo método de digestão assistida por micro-ondas, a partir da Equação 3 (item 3.6), e os resultados são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS APLICADO NA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR PARA A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE METAIS EM MELADO DE CANA.

<i>Ensaio</i>	Composição do Solvente Extrator (mL)			Taxa de extração dos metais (%)				
	<i>HNO₃</i>	<i>HCl</i>	<i>H₂O</i>	<i>Mg</i>	<i>Ca</i>	<i>Mn</i>	<i>Fe</i>	<i>P</i>
1	5,00	0,00	0,00	93,98	87,47	73,85	64,43	77,38
2	0,00	5,00	0,00	88,96	90,46	61,40	58,56	131,17
3	0,00	0,00	5,00	90,36	78,84	100,32	95,74	121,02
4	2,50	2,50	0,00	89,91	85,95	70,54	68,06	78,94
5	2,50	0,00	2,50	91,45	91,16	90,89	84,74	112,47
6	0,00	2,50	2,50	89,77	93,18	73,07	75,40	125,45
7	1,67	1,67	1,67	90,92	89,69	77,04	76,51	103,40
8	1,67	1,67	1,67	89,67	88,72	77,56	76,43	103,30
9	1,67	1,67	1,67	91,12	88,68	77,13	76,92	100,47
10	1,67	1,67	1,67	89,85	83,59	76,53	76,45	101,73

Como pode ser observado na Tabela 4, foram obtidas baixas taxas de extração para o Fe e o Mn quando se utilizou ácidos como reagentes extratores (HNO₃ e HCl). No entanto, estes metais apresentaram taxas de extração na faixa de 95,0 – 100,0 % quando se fez uso de água ultrapura. Já para o Mg e Ca, estes apresentaram taxas de extração muito próximas com o uso de uma mistura binária de ácido nítrico e água ultrapura, sendo estas > 90,0 %. Para o P, taxas de extração mais próximas a 100,0 % foram obtidas com uma mistura ternária de ácido nítrico, de ácido clorídrico e de água ultrapura.

Devido ao comportamento diferenciado apresentado na extração dos metais de interesse e do P, na amostra de melado, em relação aos solventes extratores estudados, os elementos foram avaliados de forma individual, a partir da análise estatística dos dados por uma análise de variância (ANOVA) da regressão linear, em que foram realizados testes de adequação dos modelos que melhor se ajustavam aos resultados, tendo em vista a investigação da sua importância estatística.

Como o Mn e o Fe, assim como o Ca e o Mg apresentaram um comportamento semelhante em relação a composição do solvente extrator, estes foram avaliados em conjunto, conforme descrito nos Capítulos 5 e 6.

REFERÊNCIAS

- AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 206-213, 2017.
- ARRUDA, S. C. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; ARRUDA, M. A. Z. Ultrasound-assisted Extraction of Ca, K and Mg from In Vitro Citrus Culture. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, p. 470-474, 2003.
- BARROS, J. M.; BEZERRA, M. A.; VALASQUES, G. S.; NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; SOUZA, A. S.; ARAGÃO, N. M. Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction procedure for Cu, Mn, Ni and Zn determination in ration to chickens. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 891-902, 2013.
- BERLAN, J.; MASON, T. J. Sonochemistry: from research laboratories to industrial plants. **Ultrasonics**, v. 30, n. 4, p.203-212, 1992.
- COSTA, V.; SILVA, E. G. P.; LIMA, D. C.; FRANCO, M.; JESUS, R. M.; BEZERRA, M. A.; AMORIM, F. A. C. 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**, p.1189-1198, 2018.
- FILGUEIRAS, A. V.; CAPELO, J. L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 53, n. 2, p. 433-441, 2000.
- HRISTOZOV, D.; DOMINI, C. E.; KMETOV, V.; STEFANOVA, V.; GEORGIEVA, D.; CANALS, A. Direct ultrasound-assisted extraction of heavy metals from sewage sludge samples for ICP OES analysis. **Anal Chim Acta**, v. 516, n. 2, p. 187-196, 2004. IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed. São Paulo, v. 1, 1020 p, 2008.
- KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**, 6ª ed., Santa Maria: UFMS, p. 282, 2006.
- MANUTSEWEE, N.; AEUNGMAITREPIROM, W.; VARANUSUPAKUL, P.; IMYIM, A. Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after

ultrasound-assisted acid leaching extraction. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 817–824, 2007.

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

PERONICO Jr., V. C. D.; RAPOSO Jr, 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. 1287-92, 2016.

PERONICO, V. C. D. **Desenvolvimento de Procedimentos para o Preparo de Amostra na Determinação de Macro e Micronutrientes em Plantas Oleaginosas por Espectrometria de Absorção Atômica**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS, 2014.

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.

REZIC, I. Optimization of ultrasonic extraction of 23 elements from cotton. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 1, p.63-69, 2009.

SAHIN, S.; SAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 595-602, 2013.

**CAPÍTULO 5. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM PARA Fe E Mn EM MELADO DE CANA**

5.1 EXTRAÇÃO DE Fe E Mn A PARTIR DE UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE

Os resultados, para as taxas de extração de Fe e Mn, determinadas pela aplicação da matriz do planejamento de misturas do tipo simplex centróide foram ajustados aos modelos estatísticos linear, quadrático e cúbico especial, a fim de se obter a melhor descrição da região experimental e assim, determinar a condição ótima de extração desses elementos na matriz do melado de cana. Os resultados da ANOVA para o Fe e para o Mn são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS LINEAR, QUADRÁTICO E CÚBICO ESPECIAL NO NÍVEL DE 95 % DE CONFIANÇA PARA Fe E Mn.

<i>Metal</i>	<i>Modelos</i>	<i>SQ</i> ¹	<i>gl</i> ²	<i>QM</i> ³	<i>F</i> _{regressão}	- <i>Valor de p</i>	<i>Raiz quadrada do QM</i>	<i>R</i> ² (%)	<i>R</i> ² _{ajustado} (%)
<i>Fe</i>	<i>Linear</i>	908,381	2	454,191	56,89 ^a	0,000	2,82	94,20	92,55
	<i>Quadrático</i>	963,775	5	192,755	1554,92 ^b	0,000	0,35	99,95	99,88
	<i>Cúbico Especial</i>	964,109	6	160,685	2981,91 ^c	0,000	0,23	99,98	99,95
<i>Mn</i>	<i>Linear</i>	969,484	2	484,742	47,60 ^a	0,000	3,19	93,15	91,19
	<i>Quadrático</i>	1039,14	5	207,829	508,94 ^b	0,000	0,64	99,84	99,65
	<i>Cúbico Especial</i>	1040,23	6	173,373	965,38 ^c	0,000	0,42	99,95	99,84

¹ SQ = Soma Quadrática; ² gl = graus de liberdade; ³ QM = Quadrado Médio; ^a $F_{crítico (0,05;2;7)} = 4,74$; ^b $F_{crítico (0,05;5;4)} = 6,26$; ^c $F_{crítico (0,05;6;3)} = 8,94$.

Os resultados da ANOVA (Tabela 5) mostraram que para os três modelos ajustados para Fe e Mn, os valores de $F_{regressão}$ foram maiores do que o valor de $F_{crítico}$ ($p < 0,05$). Sendo assim, apenas o modelo quadrático e o modelo cúbico especial apresentaram valores de coeficiente de determinação (R^2 e $R^2_{ajustado}$) $> 99,0$ %, indicando um melhor ajuste dos resultados e menor efeito dos resíduos para esses modelos. Também foi verificado, a partir da análise do valor de $F_{regressão}$, que o acréscimo de mais um termo no modelo cúbico não apresenta vantagens para a descrição dos dados experimentais, além de tornar a equação matemática mais complexa.

Outro parâmetro observado foi a raiz quadrada do quadrado médio do resíduo, o qual deve apresentar o menor valor possível para que o modelo apresente melhor ajuste.

Dessa forma, foi verificado que os valores da raiz quadrada do quadrado médio do resíduo para cada modelo avaliado foram menores para o Fe (0,35) e Mn (0,64), quando ajustado o modelo quadrático, confirmando que o modelo quadrático para esses metais apresenta um melhor ajuste.

Dessa forma, visto que o modelo quadrático foi o mais adequado para descrever os resultados experimentais foi averiguado ainda se o mesmo poderia apresentar falta de ajuste. De acordo com Barros et al. (2013), quando o modelo matemático se ajusta aos dados experimentais, o quadrado médio da falta de ajuste deve apresentar apenas os erros aleatórios referentes ao sistema. Assim, os resultados para a falta de ajuste do modelo quadrático foram gerados e são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - RESULTADOS PARA A AVALIAÇÃO DA FALTA DE AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA Fe E Mn.

Metal		SQ'	gl^2	QM^3	F	p-valor
	Modelo Quadrático	963,775	5	192,755	1554,92 ^a	0,000
<i>Fe</i>	<i>Erro residual</i>	0,496	4	0,124	-	-
	<i>Falta de ajuste</i>	0,334	1	0,334	6,20 ^b	0,088
	<i>Erro puro</i>	0,162	3	0,054	-	-
	<i>Total ajustado</i>	964,271	9	-	-	-
	Modelo Quadrático	1039,14	5	207,829	508,94 ^a	0,000
<i>Mn</i>	<i>Erro residual</i>	1,633	4	0,408	-	-
	<i>Falta de ajuste</i>	1,095	1	1,095	6,10 ^b	0,090
	<i>Erro puro</i>	0,539	3	0,180	-	-
	<i>Total ajustado</i>	1040,78	9	-	-	-

¹ SQ = Soma Quadrática; ² gl = graus de liberdade; ³ QM = Quadrado Médio; ^a $F_{crítico (0,05;5;4)} = 6,26$ para a regressão; ^b $F_{crítico (0,05;1;3)} = 10,1$ para a falta de ajuste.

Os resultados da Tabela 6 mostram que os valores de F_{faj} para Fe e Mn foram menores do que o valor de $F_{crítico}$ ($p > 0,05$). Com isso, observa-se que os mesmos não foram significativos no nível de confiança de 95 %, indicando que não há falta de ajuste do modelo quadrático para ambos os metais. Em vista disso, foi confirmado que o modelo quadrático descreve a região experimental dos dados de forma adequada.

Com a escolha do modelo adequado é possível avaliar se as condições são ótimas em relação aos dados gerados por um modelo utilizando a equação da regressão

e obtendo-se os gráficos de contorno. No que diz respeito a equação de regressão, para este estudo foi aplicada a equação de regressão ajustada ao modelo quadrático (Equação 9).

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 \quad \text{Equação 9}$$

Onde y é o valor inicial, x_i descreve os valores das misturas e os valores de b (b_1 , b_{12} , b_{123}) são os coeficientes da função de regressão, conforme descrito por Yolmeh et al. (2017).

Os modelos das equações com os coeficientes de regressão estimados (quantidades de componentes [x_1 (HNO_3), x_2 (HCl) e x_3 (H_2O)]) para o Fe e para o Mn estão apresentados nas Equações 10 e 11, respectivamente.

$$y_{(\% \text{ de extração})} = \mathbf{12,90} (\pm 0,0699)x_1 + \mathbf{11,72} (\pm 0,0699)x_2 + \mathbf{19,16} (\pm 0,0699)x_3 + \mathbf{0,995} (\pm 0,060)x_1x_2 + \mathbf{0,690} (\pm 0,060)x_1x_3 - \mathbf{0,334} (\pm 0,060)x_2x_3 \quad \text{Equação 10}$$

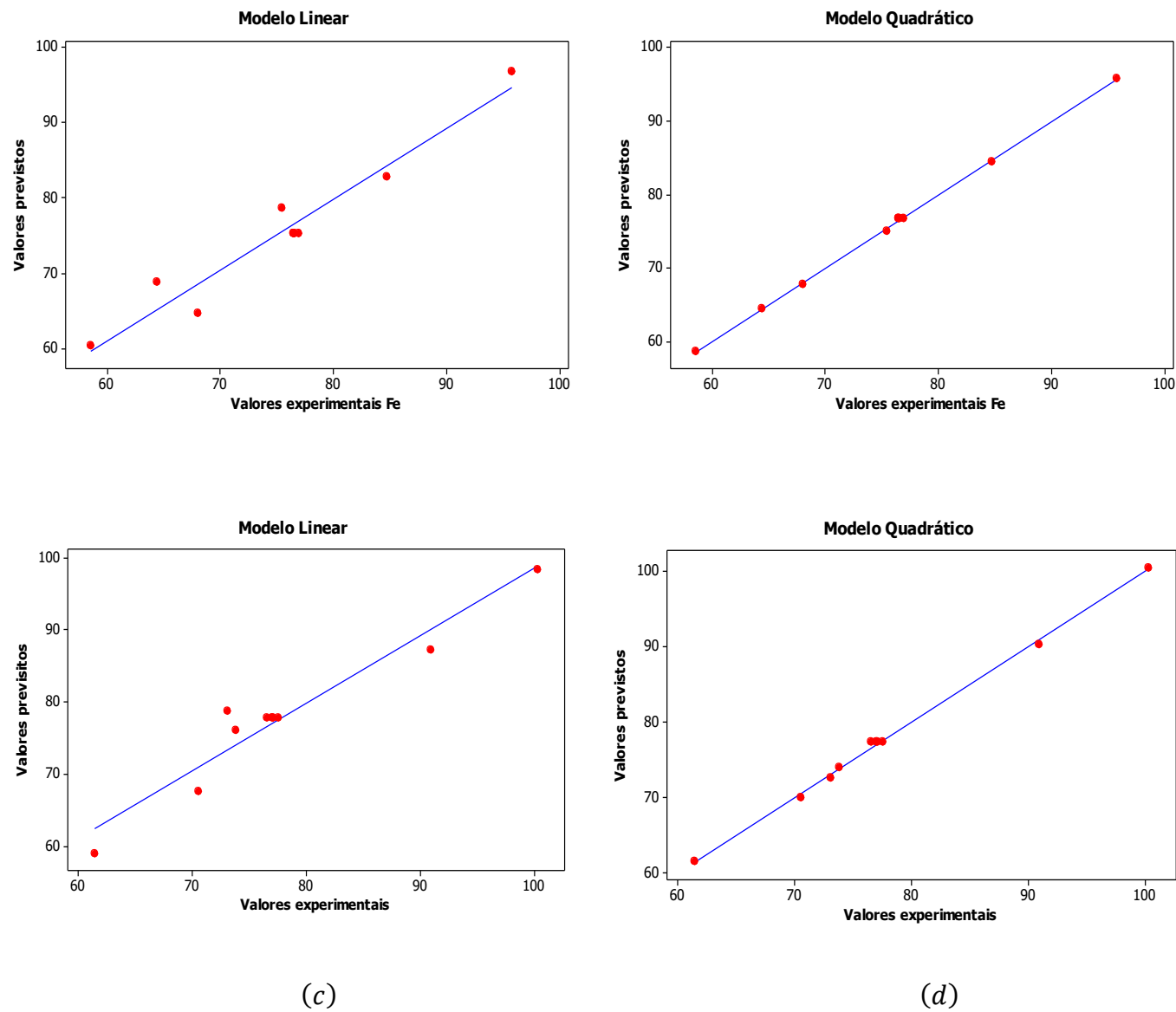
$$y_{(\% \text{ de extração})} = \mathbf{14,79} (\pm 0,1269)x_1 + \mathbf{12,30} (\pm 0,1269)x_2 + \mathbf{20,09} (\pm 0,1269)x_3 + \mathbf{0,367} (\pm 0,1096)x_1x_2 + \mathbf{0,509} (\pm 0,1096)x_1x_3 - \mathbf{1,345} (\pm 0,1096)x_2x_3 \quad \text{Equação 11}$$

Os valores entre parênteses correspondem aos intervalos de confiança dos coeficientes e sua significância foi avaliada pela aplicação de um *teste-t*. A análise da equação de regressão indicou que há uma interação estatisticamente significativa entre sistemas de dois componentes. A equação mostra, ainda, os pontos críticos para cada variável, em que é possível realizar cálculos para os valores previstos (FERREIRA, 2015). Estes foram então aplicados no método de regressão linear para avaliar o modelo estabelecido.

Com base nos cálculos aplicados, a partir da Equação 9, em relação ao modelo ajustado para ambos os metais, foram construídos os gráficos de valores observados versus os valores previstos para os modelos linear e quadrático para o Fe e o Mn (Figuras 3a e 3b para o Fe; Figuras 3c e 3d para o Mn). Estes gráficos demonstram que o modelo quadrático apresenta uma melhor correlação dos dados experimentais com os dados previstos, em relação ao modelo linear. Com isso, ressaltam-se as observações

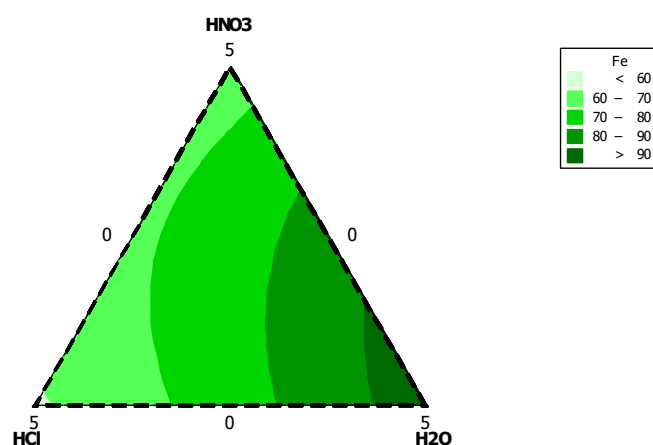
descritas anteriormente, confirmando que o modelo quadrático pode ser usado para determinar as condições ótimas de extração.

FIGURA 3 – GRÁFICOS DE VALORES PREVISTOS *VERSUS* VALORES OBSERVADOS: (a) PARA O MODELO LINEAR E (b) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O Fe; (c) PARA O MODELO LINEAR E (d) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O Mn.

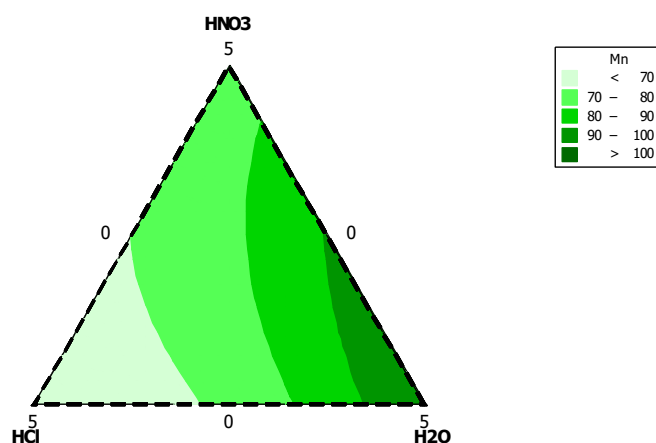


Após a determinação do modelo que melhor descreveu o método de extração de Fe e Mn para melado de cana foram construídos os gráficos de contorno de modo a observar, a região que proporciona uma extração mais eficiente dos metais considerando os solventes extratores avaliados. Os gráficos de contorno para Fe e Mn são apresentados na Figura 4.

FIGURA 4 – GRÁFICOS DE CONTOURNO DE MISTURAS GERADOS PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX CENTRÓIDE CONSIDERANDO OS VALORES DE TAXAS DE EXTRAÇÃO PARA (a) Fe E (b) Mn EM MELADO DE CANA.



(a)



(b)

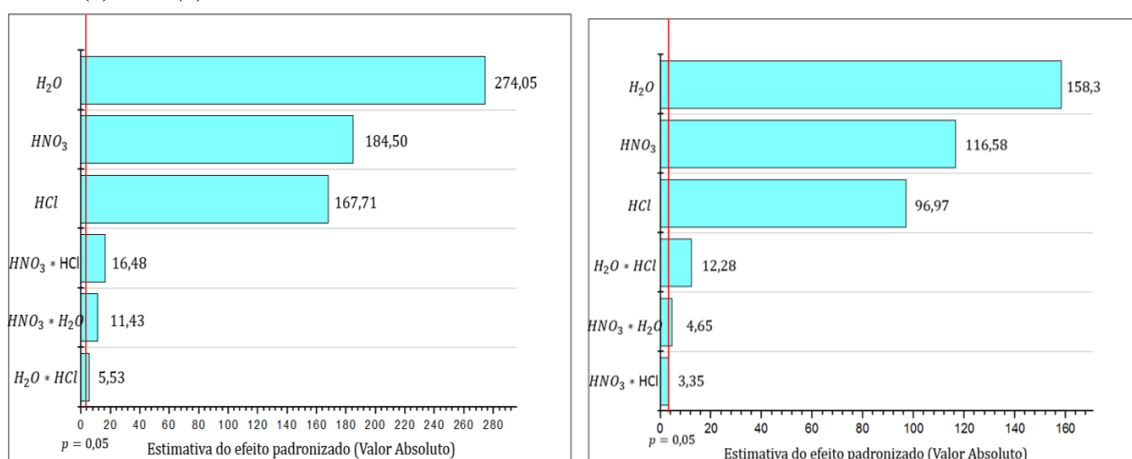
Como pode ser visto os gráficos de contorno para o Fe (Figura 4a) e Mn (Figura 4b) apresentaram um comportamento semelhante. É possível verificar que quando se faz

uso de ácidos puros (HNO_3 e HCl) ou de misturas binárias e ternárias destes as taxas de extração são menores que 80,0 %. Entretanto, as maiores porcentagens de extração (> 90,0 %) de ambos os metais são obtidas usando como solvente extrator, a água. Assim, verificou-se que à medida que aumenta a proporção de água no meio reacional, as taxas de extração dos metais Fe e Mn, também aumentam.

Na extração assistida por ultrassom, quando há a presença de água no meio reacional, no processo de cavitação e propagação de ondas, pode ocorrer a formação direta de radicais livres H^+ e HO^- . A reatividade desses radicais favorece a rápida interação destas espécies com íons, moléculas, ou ainda, podem gerar novos radicais livres (KORN, PEREIRA e BORGES, 2005; DE PAULA et al., 2013). Considerando que a água é um solvente extrator menos oxidante ou complexante, do que os ácidos inorgânicos investigados, acredita-se que a ligação dos metais Mn e Fe a matriz do melado de cana não seja muito forte. Esta afirmação é corroborada pelos trabalhos de Pohl et al. (2012) e Bogdanov et al. (2008) em mel. Estes autores verificaram que em amostras de méis, o Fe e o Mn são elementos que possuem afinidade para formar complexos com substâncias orgânicas como proteínas, aminoácidos e principalmente com os compostos fenólicos. Dessa forma, supõe-se que esses elementos podem estar ligados a diferentes bioligantes endógenos, como espécies lábeis, que podem favorecer a sua biodisponibilidade em matrizes ricas em açúcares, quando são submetidos ao processo de cavitação, em meio aquoso, não necessitando assim de reagentes extratores com caráter mais oxidante ou complexante. Dessa forma, ocorre, assim, a liberação destes metais em solução, a partir da degradação dos compostos fenólicos pela formação dos radicais hidroxila (FANG, MARK e SONNTAG, 1996; KORN, PEREIRA e BORGES, 2005; DEAN, 2007).

Ainda, para avaliar a significância dos efeitos dos fatores principais e dos efeitos de interação entre as variáveis (HCl , HNO_3 e H_2O), na extração de Fe e de Mn pelo planejamento de misturas, foi aplicado um *teste-t* e construído o gráfico de Pareto para o modelo quadrático ajustado (Figuras 5a e 5b).

FIGURA 5 – GRÁFICOS DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA (a) Fe E (b) Mn.



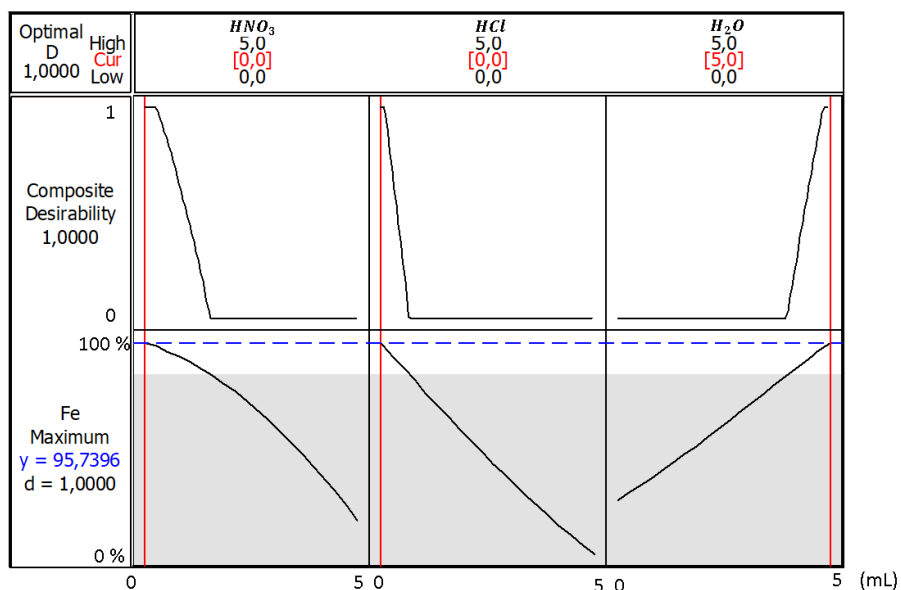
(a)

(b)

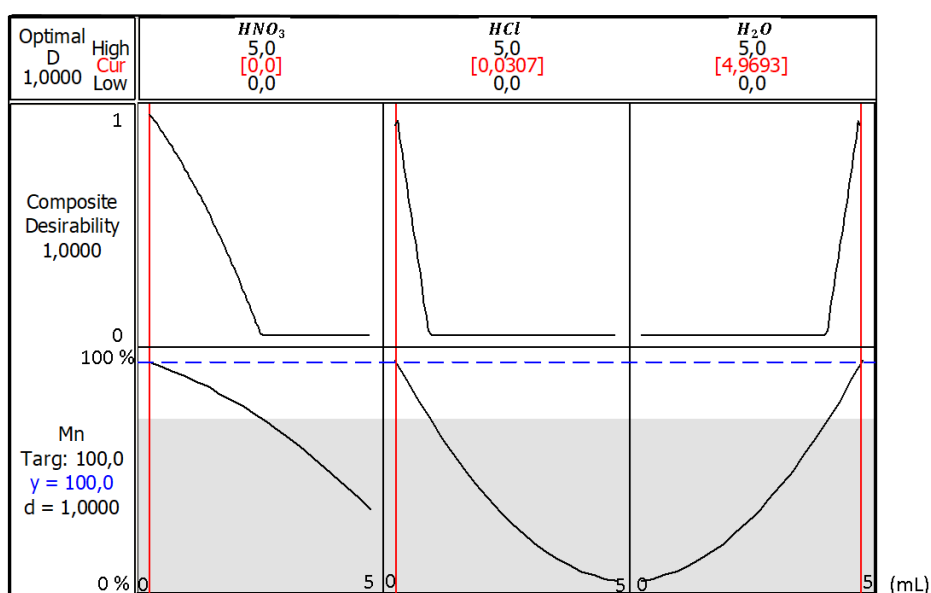
Os valores obtidos pelo *teste-t* indicam que a presença de água ultrapura proporciona maiores taxas de extração dos minerais, Fe e Mn, em relação aos demais solventes extratores. No que diz respeito às misturas, foi observado que os efeitos de interação são estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Contudo, os efeitos de interação entre HNO_3 e HCl , HNO_3 e H_2O e entre H_2O e HCl apresentaram uma menor significância quando comparados com os efeitos dos componentes puros. Isso permite a avaliação dos efeitos do reagente extrator de forma independente. Assim, como observado no gráfico de contorno (Figura 4) e pelos resultados das taxas de extração (Tabela 4, apresentada no Capítulo 4) o solvente extrator água permitiu uma maior taxa de extração de Fe e de Mn em melado de cana em relação aos outros solventes extratores estudados.

Com base nisso, e tendo em vista que a região ótima de extração compreende uma maior presença de água no meio extrator, foi possível calcular a desejabilidade, reforçando a avaliação visual dos gráficos de contorno. Ressalta-se que, as funções de desejabilidade individuais utilizadas nesse estudo tiveram como finalidade a maximização das respostas, de forma a encontrar as melhores proporções do solvente extrator, ou seja, que apresentassem a maior porcentagem de extração (próxima a 100,0 % para Mn e de 96,0 % para Fe), dentro da região ótima estabelecida. Assim, foram construídos os gráficos dos perfis de desejabilidade, os quais são apresentados na Figura 6.

FIGURA 6 – PERFIS PARA OS VALORES PREVISTOS PARA A DESEJABILIDADE INDIVIDUAL DA OTIMIZAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS VARIÁVEIS DE MISTURA PARA (a) Fe E (b) Mn.



(a)



(b)

Como mostra a Figura 6a e 6b, a desejabilidade máxima obtida para Fe e para Mn nas condições descritas anteriormente foi igual a 1. Os perfis de desejabilidade individual variam de acordo com os limites estabelecidos para L (menor valor aceito como resposta), T (maior valor para o conjunto de dados) e s (peso igual a 1,0), conforme a Equação 1 (item 2.6, Capítulo 2). Este valor, geralmente, varia de 0 a 1, sendo as coordenadas desses pontos as proporções de solvente extrator. Quanto mais próximo de 1,0 melhor será a condição otimizada para aquele metal (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2006; BEZERRA et al., 2019).

Considerando que os valores individuais, para a condição ótima correspondente a cada resposta, ficaram próximos entre si para Fe e Mn, foi possível estabelecer uma condição experimental que englobasse simultaneamente a capacidade de extração para ambos os metais. Dessa forma, a extração mais eficiente para Fe e Mn foi obtida com a utilização de 0,5 gramas de melado de cana, 5,0 mL de água ultrapura como solvente extrator, 10 minutos de extração em banho ultrassônico com potência de 100 W, temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e frequência de sonicação de 37 kHz.

REFERÊNCIAS

BARROS, J. M.; BEZERRA, M. A.; VALASQUES, G. S.; NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; SOUZA, A. S.; ARAGÃO, N. M. Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction procedure for Cu, Mn, Ni and Zn determination in ration to chickens. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 891-902, 2013.

BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P. dos.; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; ALVES, J. P. S. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. *Talanta*, v. 194, p. 941-959, 2019.

BOGDANOV, S.; JURANDIC, T.; SIEBER, R.; GALLMANN, P. Honey for nutrition and health: A review. **Journal of the American Collage of Nutrition**, v. 27, p. 677–689, 2008.

BRUNS, R. E; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. Statistical Design – Chemometrics, 1st ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2006.

DE PAULA, C. E. R.; CALDAS, L. F. S.; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Development of a focused ultrasound-assisted extraction method for the determination of trace concentrations of Cr and Mn in pharmaceutical formulations by ETAAS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 284–290, 2013.

DEAN, J. R. **Bioavailability, bio accessibility and mobility of environmental contaminants**. Chichester: John Willey & Sons, 2007.

FANG, X.; MARK, G.; SONNTAG, C. OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter, **Ultrason. Sonochem.**, v. 3, p. 57–63, 1996.

FERREIRA, S. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Editora Vento Leste, 2015, 190 p.

KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S. Algumas Aplicações Analíticas dos Ultrassons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 96, p. 51-6, 2005.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**, 6^a ed., Santa Maria: UFMS, p. 282, 2006.

POHL, P.; STECKA, H.; GREDA, K.; JAMROZ, P. Bio accessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p.392-396, 2012.

YOLMEH, M., KHOMEIRI, M., AHMADI, Z. Application of mixture design to introduce an optimum cell-free supernatant of multiple-strain mixture (MSM) for *Lactobacillus* against food-borne pathogens. **LWT-Food Sci. Technol**, v. 83, p. 298–304, 2017.

**CAPÍTULO 6. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM PARA Ca E Mg EM MELADO DE CANA**

6.1 EXTRAÇÃO DE Ca E Mg A PARTIR DE UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE

De forma semelhante ao Fe e ao Mn, com base nas taxas de extração para o Mg e para o Ca (Tabela 4, apresentada no Capítulo 4), uma Análise de Variância (ANOVA) da regressão linear foi aplicada para verificar qual modelo matemático melhor se ajustava aos dados, para esses metais, em um nível de confiança de 95 %. Os modelos testados foram o linear, o quadrático e o cúbico especial e os resultados são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS LINEAR, QUADRÁTICO E CÚBICO ESPECIAL NO NÍVEL DE 95% DE CONFIANÇA PARA Mg E Ca.

<i>Metal</i>	<i>Modelos</i>	<i>SQ¹</i>	<i>gl²</i>	<i>QM³</i>	<i>F_{regressão}</i>	<i>- Valor de p</i>	<i>Raiz quadrada do QM</i>	<i>R² (%)</i>	<i>R²_{ajustado} (%)</i>
<i>Mg</i>	<i>Linear</i>	33,543	2	16,771	22,75 ^a	0,000	0,86	76,47	73,11
	<i>Quadrático</i>	42,649	5	8,5298	77,22 ^b	0,000	0,33	97,23	95,97
	<i>Cúbico Especial</i>	42,837	6	7,1396	69,55 ^c	0,000	0,32	97,66	96,26
<i>Ca</i>	<i>Linear</i>	65,18	2	32,589	1,89 ^a	0,187	4,15	21,29	10,04
	<i>Quadrático</i>	260,111	5	52,022	12,41 ^b	0,000	2,05	84,94	78,10
	<i>Cúbico Especial</i>	270,074	6	45,0124	12,45 ^c	0,000	1,90	88,20	81,12

¹ SQ = Soma Quadrática; ² gl = graus de liberdade; ³ QM = Quadrado Médio ajustado; ^a $F_{crítico (0,05;2;14)} = 3,74$; ^b $F_{crítico (0,05;5;11)} = 3,20$; ^c $F_{crítico (0,05;6;10)} = 3,21$.

Os resultados da ANOVA (Tabela 7) mostraram que os três modelos testados apresentaram significância estatística para o Mg e apenas os modelos quadrático e cúbico especial para o Ca, com valores de $F_{regressão}$ maiores do que o valor de $F_{crítico}$ ($p < 0,05$). Entretanto, o modelo linear não foi adequado para explicar o conjunto de dados para o Mg, quando comparado ao modelo quadrático e ao modelo cúbico especial (R^2 e $R^2_{ajustado} > 95,0\%$), pois apresentou baixos valores de coeficiente de determinação ($R^2 = 76,47$ e $R^2_{ajustado} = 73,11\%$), indicando que os modelos quadrático e cúbico especial apresentam um menor efeito dos resíduos em relação ao modelo linear. Para Ca, os modelos quadrático e cúbico especial apresentaram valores de coeficiente de determinação (R^2 e $R^2_{ajustado}$) próximos a 80,0 %, indicando que há um melhor ajuste dos resultados e menor efeito dos resíduos. Contudo, a partir da análise do valor de

$F_{regressão}$ foi possível constatar que o acréscimo de mais um termo, relacionado ao modelo cúbico especial não apresenta vantagens para a descrição dos dados experimentais, além de tornar a equação matemática mais complexa. Dessa forma, para ambos os metais, o modelo quadrático foi escolhido para descrever a região experimental dos dados.

Outro parâmetro verificado foi o valor da raiz quadrada do quadrado médio do resíduo, sendo que este foi menor quando ajustado o modelo quadrático (Mg = 0,33 e Ca = 2,05), o que demonstrou que o modelo quadrático para esses metais apresenta um melhor ajuste.

Assim, o teste de falta de ajuste foi aplicado ao modelo quadrático para Mg e Ca (Tabela 8). Os resultados, ($F_{faj} < F_{crítico}$, com valor de $p > 0,05$), em um nível de 95 % de confiança mostraram que o modelo quadrático é adequado e não apresenta falta de ajuste para ambos os metais.

TABELA 8 – AVALIAÇÃO DA FALTA DE AJUSTE DOS MODELOS QUADRÁTICOS AJUSTADOS PARA Mg E Ca.

Metal		SQ'	gl^2	QM^3	F	Valor de p
Mg	Modelo Quadrático	42,649	5	8,5298	77,22 ^a	0,000
	<i>Erro residual</i>	1,2151	11	0,1105	-	-
	<i>Falta de ajuste</i>	0,1885	1	0,1885	1,84 ^b	0,205
	<i>Erro puro</i>	1,0265	10	0,1027	-	-
	<i>Total ajustado</i>	43,8640	16	-	-	-
Ca	Modelo Quadrático	260,111	5	52,022	12,41 ^a	0,000
	<i>Erro residual</i>	46,105	11	4,191	-	-
	<i>Falta de ajuste</i>	9,963	1	9,963	2,76 ^b	0,128
	<i>Erro puro</i>	36,142	10	3,614	-	-
	<i>Total ajustado</i>	306,216	16	-	-	-

¹ SQ = Soma Quadrática; ² gl = graus de liberdade; ³ QM = Quadrado Médio; ^a $F_{crítico} (0,05;5;11) = 3,20$ para a regressão; ^b $F_{crítico} (0,05;1;10) = 4,96$ para a falta de ajuste.

Para os modelos quadráticos ajustados ao Mg e ao Ca, também foram obtidas as equações de regressão conforme a Equação 9, descrita no item 5.1 (Capítulo 5). Os modelos da equação com os coeficientes de regressão estimados (quantidades de componentes) para o Mg e para o Ca estão apresentados nas Equações 12 e 13, em que x_1 , x_2 e x_3 são os respectivos componentes da mistura (HNO_3 , HCl e H_2O).

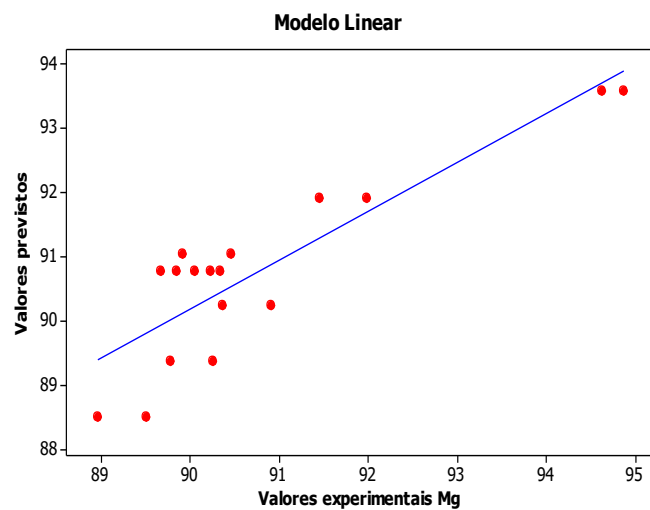
$$Y(\% \text{ de extração}) = \mathbf{18,95} (\pm 0,047)x_1 + \mathbf{17,85} (\pm 0,047)x_2 + \mathbf{18,13} (\pm 0,047)x_3 - \mathbf{0,316} (\pm 0,041)x_1x_2 - \mathbf{0,183} (\pm 0,041)x_1x_3 - 0,014 (\pm 0,041)x_2x_3 \quad \text{Equação 12}$$

$$Y(\% \text{ de extração}) = \mathbf{17,54} (\pm 0,2878)x_1 + \mathbf{18,14} (\pm 0,2878)x_2 + \mathbf{15,81} (\pm 0,2878)x_3 - \mathbf{0,678} (\pm 0,2537)x_1x_2 + \mathbf{1,085} (\pm 0,2537)x_1x_3 + \mathbf{1,169} (\pm 0,2537)x_2x_3 \quad \text{Equação 13}$$

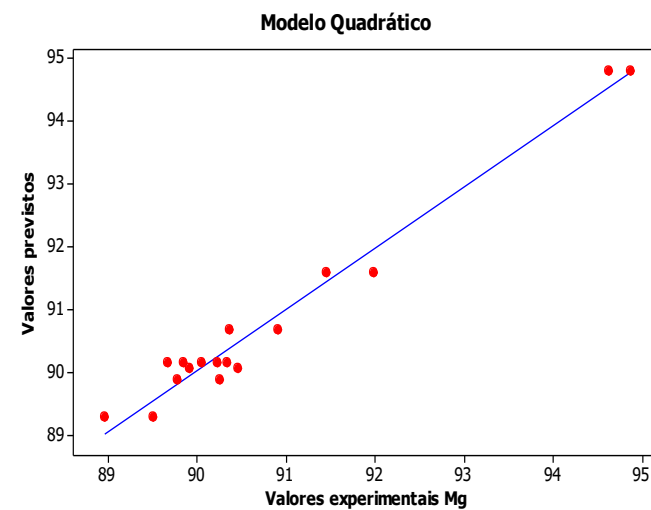
Os valores entre parênteses correspondem aos intervalos de confiança dos coeficientes e sua significância foi avaliada pela aplicação de um *teste-t*. A equação da regressão mostrou que há uma interação estatisticamente significativa entre sistemas de dois componentes, em que os pontos críticos para cada variável, foram destacados em negrito.

Posteriormente, com base nos cálculos das equações do modelo quadrático (Equação 12 e 13), foi realizada uma análise dos gráficos de resíduos dos dados experimentais em relação aos dados ajustados para os modelos linear e quadrático (Figuras 7). A análise dos gráficos para os modelos linear (Figura 7a e 7c) e quadrático (Figura 7b e 7d) indicou que o modelo de regressão ajustado (quadrático) apresentou uma distribuição dos pontos mais próxima a reta, correlacionando melhor os resultados experimentais com os resultados previstos, quando comparado ao modelo linear.

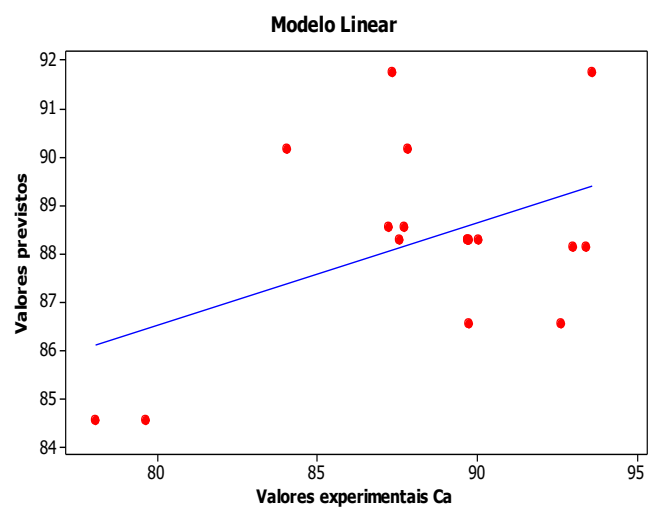
FIGURA 7 - GRÁFICO DE VALORES PREVISTOS *VERSUS* VALORES OBSERVADOS: (a) E (c) PARA O MODELO LINEAR E (b) E (d) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O Mg E PARA O Ca.



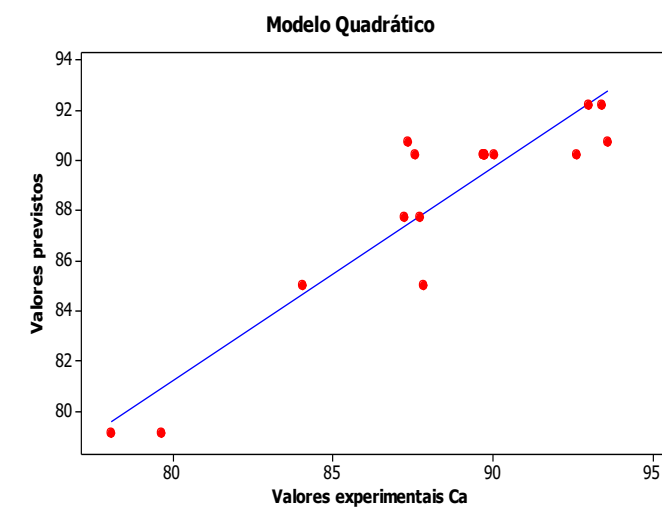
(a)



(b)



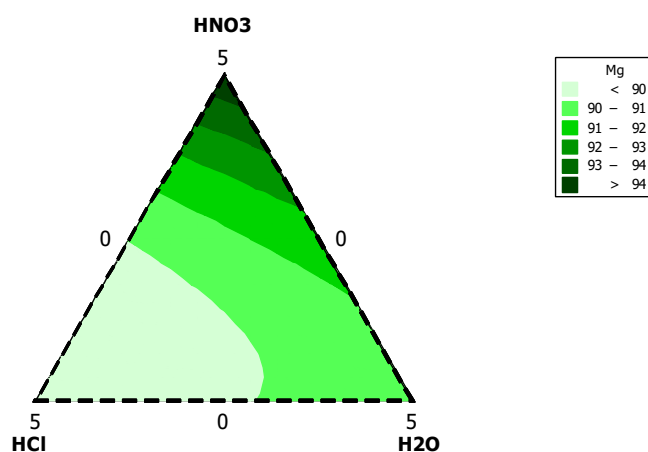
(c)



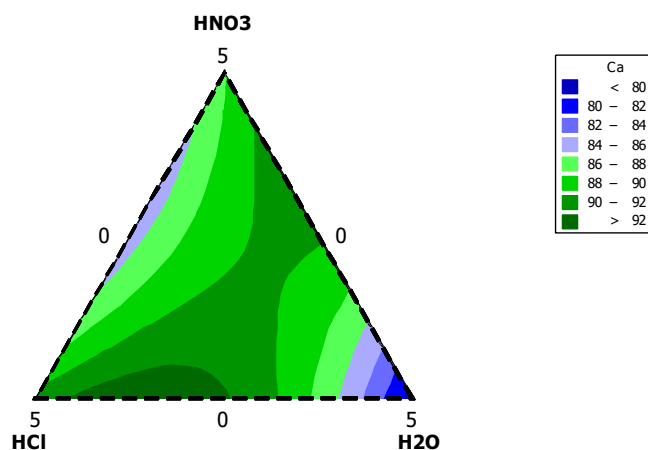
(d)

Após definir o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foram gerados os gráficos de contorno obtidos pelo planejamento de misturas do tipo simplex centróide, que estabelece por meio das taxas de extração do Mg e do Ca (expressa em porcentagem), quais solventes extratores apresentam maior eficiência, como mostra a Figura 8.

FIGURA 8 - GRÁFICO DE CONTOURNO DE MISTURAS GERADO PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO CONSIDERANDO OS VALORES DE EXTRAÇÃO PARA (a) Mg E (b) Ca EM MELADO DE CANA.



(a)



(b)

Pela análise do gráfico de contorno (Figura 8) é possível verificar que taxas de extração individuais mais altas de Mg e Ca podem ser obtidas quando se faz uso de apenas um ácido inorgânico. Contudo, a utilização de uma mistura binária foi escolhida

nesse caso, com o intuito de se buscar uma região comum entre os dois metais de interesse. Assim, uma mistura de HNO_3 e H_2O , como reagentes extratores, foi utilizada devido a mesma apresentar taxas de extração $> 90,0\%$, para ambos os metais, conforme pode ser observado na Figura 8 (região experimental correspondente as arestas do gráfico de contorno).

Em alimentos com altos teores de açúcares, o Ca e o Mg são predominantemente originados do processamento tecnológico, isto é, pela adição de hidróxidos durante a concentração e/ou clarificação do caldo, como é o caso do açúcar refinado (BRUIJN e BOUT, 1999; SKRBIC et al., 2010). O excesso desses metais é normalmente eliminado pela passagem de CO_2 no processo de precipitação do caldo dos respectivos carbonatos, sulfitos e sulfatos desses elementos (SKRBIC et al., 2010). Entretanto, quando esse processo é incompleto, concentrações relativamente altas de Ca e de Mg ainda permanecem no açúcar (BRUIJN e BOUT, 1999; MOHAMED, 1999; SKRBIC et al., 2010). No que diz respeito ao melado, a presença desses elementos, pode ser advinda da planta de cana de açúcar, já que muitas vezes esse alimento é produzido de maneira artesanal e não passa por um rigoroso processo de fabricação, fazendo com que resíduos oriundos da cana permaneçam em sua composição, mesmo após o processo de concentração do caldo.

Os principais elementos presentes na superfície das plantas são geralmente o carbono e o oxigênio. Contudo, a cana de açúcar apresenta uma grande heterogeneidade morfológica em sua superfície, como a presença de fibras, nas quais, podem ser encontrados os elementos nitrogênio, cálcio, silício e enxofre. Além disso, destaca-se que Ca pode ser encontrado em todas as partes da planta e pode estar associado às substâncias pécticas, que contém este elemento (WILLATS et al., 2001; MENDES et al., 2015).

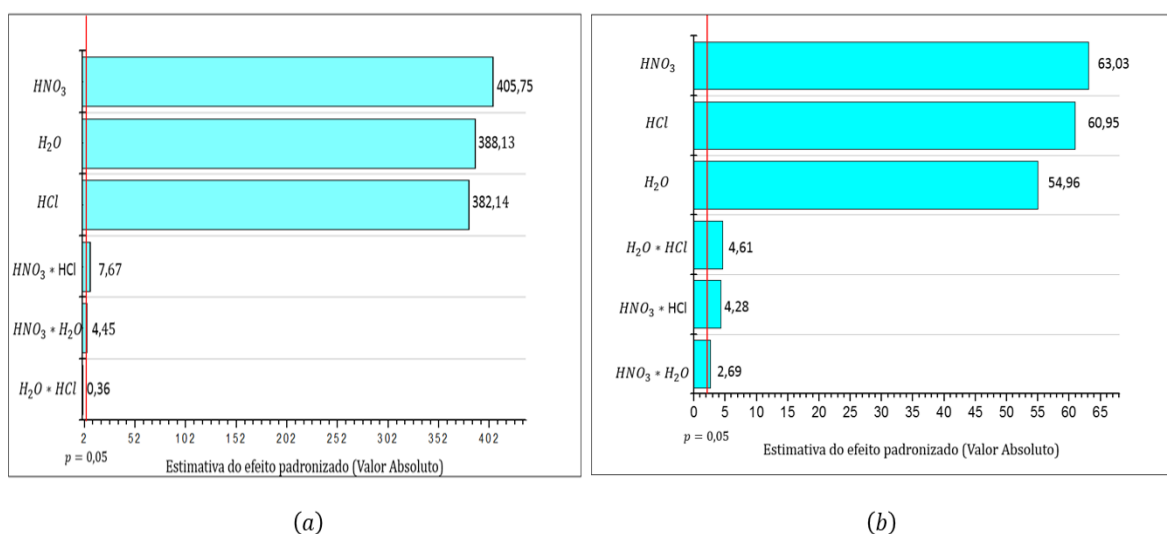
Ressalta-se também, que a presença de Mg em subprodutos da cana de açúcar está relacionada aos altos índices de cor e que a principal fonte deste elemento no melado de cana provém da planta assim como seus principais corantes como as clorofilas e flavonoides. Com isso, estes acabam contribuindo para a formação de pigmentos coloridos (que possuem elevado peso molecular), da mesma maneira que os compostos fenólicos, os açúcares redutores e os aminoácidos (PATON, 1992). Além disso, a formação destes pigmentos, muitas vezes é auxiliada pelo Mg, já que este contribui na degradação da sacarose (EGGLESTON et al., 1996).

Dessa forma, tendo em vista que a disponibilidade do Mg e do Ca, em matrizes com altos teores de açúcares está relacionada com os tipos de ligações que estes elementos fazem com moléculas orgânicas, as soluções ácidas concentradas são comumente empregadas, uma vez que o íon H^+ auxilia no deslocamento dos metais presentes na matriz sólida para a solução extratora (DE PAULA et al., 2013). Em relação ao Ca, quando sua extração ocorre em meio ácido, sua disponibilidade é aumentada devido à protonação dos grupos funcionais que estão ligados a matriz, como pode ser o caso de ligações com grupos carboxílicos, em que ocorre a competição dos íons H^+ com os metais por sítios de ligação, favorecendo as ligações HO^- (SOLIMAN, AHMED e FADL, 2011).

Com isso, a natureza do ácido empregado, bem como suas propriedades oxidantes, pode auxiliar na oxidação/degradação da matriz da amostra, liberando mais facilmente estes metais para a solução, como foi observado nas taxas de extração obtidas para o Mg e o Ca em meio ácido. Já a água, presente na mistura, teve como intuito auxiliar na diminuição da viscosidade dos ácidos inorgânicos concentrados, como é o caso do ácido nítrico, fazendo com que a extração do metal ocorresse mais facilmente.

Em seguida, a significância dos efeitos principais e de interação entre os fatores do planejamento de misturas para o Mg e para o Ca foram avaliadas pela aplicação de um teste-*t* e pela construção do gráfico de Pareto (Figura 9).

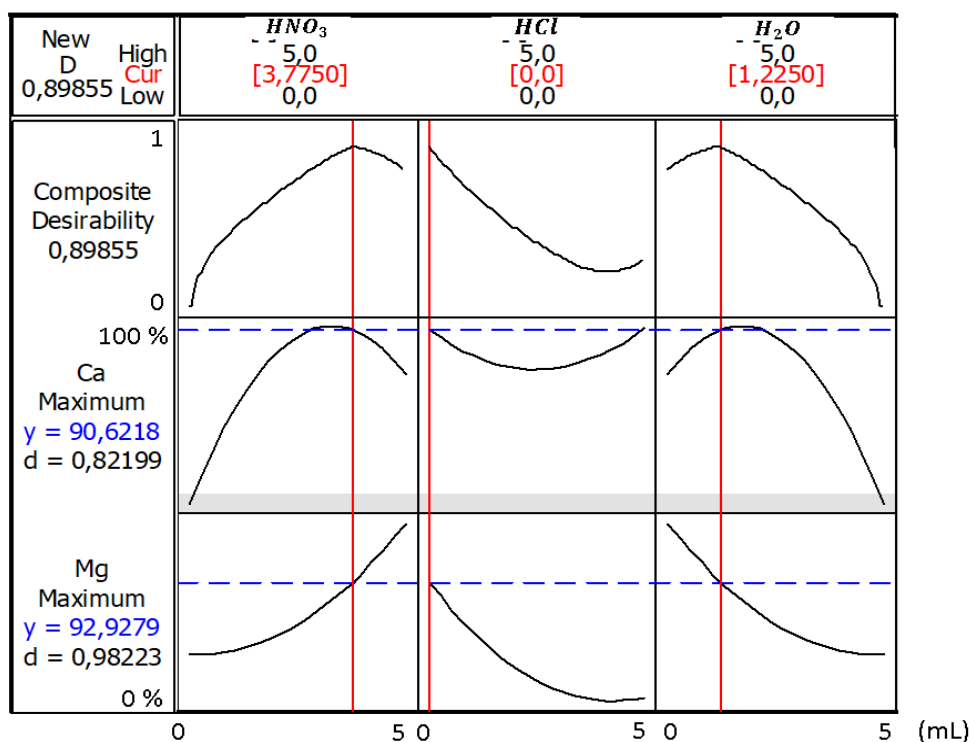
FIGURA 9 – GRÁFICOS DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA (a) Mg E (b) Ca.



Os resultados do *teste-t* (Figura 9) indicaram que quando se faz uso de HNO_3 puro, como solvente extrator, este proporciona maiores taxas de extração para Mg e Ca quando comparado aos demais solventes extratores. Referente as misturas, os resultados sugeriram que os efeitos de interação para o Mg são estatisticamente significativos para as interações entre HNO_3 e HCl e entre HNO_3 e H_2O ($p < 0,05$). Contudo, as interações entre H_2O e HCl não demonstraram um efeito de interação significativo, o que indica que somente a mistura desses dois componentes não contribui para a extração do Mg. Já para Ca, todos os efeitos de interação se mostraram significativos ($p < 0,05$). De forma geral, as misturas apresentaram pouca significância para a extração do Mg e do Ca quando comparadas com os componentes puros, demonstrando que a avaliação do efeito do solvente, para a extração desses elementos, pode ser feita de forma independente.

Em seguida, foi construído o gráfico com os perfis de desejabilidade individual, com base no solvente extrator, para o Mg e o Ca, de acordo com a Figura 10. Ressaltando que, para encontrar as melhores proporções do solvente, as funções de desejabilidade tiveram suas respostas maximizadas (taxas de extração próximas a 100,0 %).

FIGURA 10 - PERFIL DOS VALORES PREVISTOS PARA A DESEJABILIDADE INDIVIDUAL DA OTIMIZAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS VARIÁVEIS DE MISTURA PARA Mg e Ca.



A desejabilidade máxima atingida para o Mg foi igual a 0,98223 e para o Ca de 0,82199. Esta é proporcional a taxa de extração prevista para ambos os metais, que apresentaram um comportamento gráfico similar. Os valores da desejabilidade variam conforme os limites para L (menor valor aceito como resposta) e T (maior valor para o conjunto de dados) são estabelecidos, sendo que o valor pode variar de 0 a 1, dependendo do conjunto dos dados experimentais. A condição ótima de otimização é alcançada quando o valor do perfil de desejabilidade fica próximo de 1,0. Com base nisso e a partir da análise do gráfico de desejabilidade (Figura 10), a melhor resposta para a extração do Mg e do Ca, em relação ao solvente extrator, foi alcançada com 3,77 mL de HNO_3 e 1,22 mL de H_2O .

REFERÊNCIAS

BRUIJN, J. M.; BOUT, M. Analytical approach to white sugar quality – anions, cations and their probable origin. **Zuckerindustrie**, v. 124, p. 532–535, 1999.

DE PAULA, C. E. R.; CALDAS, L. F. S.; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Development of a focused ultrasound-assisted extraction method for the determination of trace concentrations of Cr and Mn in pharmaceutical formulations by ETAAS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 284–290, 2013.

EGGLESTON, G., VERCELLOTTI, J.R., EDYE, L.A., CLARKE, M.A. Effects of salts in the initial thermal degradation of concentrated aqueous solutions of sucrose. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.15, p. 81-94, 1996.

MENDES, F. M.; HEIKKILA, E.; FONSECA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; FARDIM, P. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p.60-67, 2015.

MOHAMED, A. E. Environmental variations of trace element concentrations in Egyptian cane sugar and soil samples (Edfu Factories). **Food Chemistry**, v. 65, p. 503–507, 1999.

PATON, N. H. The Origin of Colour in Raw Sugar. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, p. 8-17, 1992.

SKRBIC, B.; DURISIC-MLADENOVIC, N.; MACVANIN, N. Determination of metal contents in sugar beet (*Beta vulgaris*) and its products: empirical and chemo metrical approach. **Food Science and Technology Research**, v. 16, p. 123–134, 2010.

SOLIMAN, E. M.; AHMED, S. A.; FADL, A. A. Removal of calcium ions from aqueous solutions by sugar cane bagasse modified with carboxylic acids using microwave-assisted solvent-free synthesis. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p.18-25, 2011.

WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J. P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Mol. Biol.**, v. 47, p. 9–27, 2001.

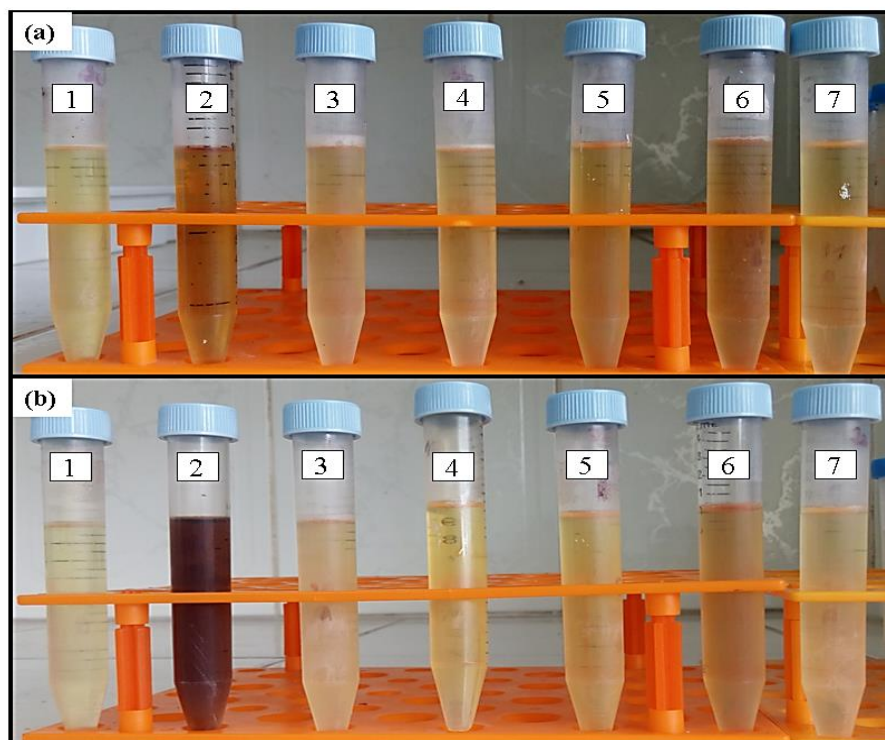
**CAPÍTULO 7. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM PARA P EM MELADO DE CANA**

7.1 AVALIAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE P EM MELADO DE CANA POR MEIO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Para determinar qual a composição do solvente extrator que proporcionaria melhores taxas de extração do P em amostras de melado de cana foi aplicada a mesma matriz do planejamento de misturas simplex centroide adotada para os outros elementos investigados. Diferentemente dos elementos Fe, Mn, Ca e Mg que tiveram seus teores determinados por F AAS, os teores de fósforo foram determinados por um método espectrofotométrico de absorção molecular no UV-VIS por meio da formação de um complexo de coloração amarela entre o fósforo e os íons vanadato e molibdato, que absorve em 420 nm.

Inicialmente, foram constatadas mudanças de coloração nos ensaios do planejamento (1 a 7) antes e após o processo de sonicação como pode ser visualizado na Figura 11. Estes fatos sugerem que há interferências de matriz decorrentes da absorção por componentes existentes naturalmente na matriz do melado de cana ou por compostos formados pela reação destes componentes em meio fortemente ácido na mesma faixa de absorção do complexo amarelo formado pelo fósforo e os íons vanadato e molibdato. Deve-se ressaltar também que a metodologia espectrofotométrica adotada neste estudo foi desenvolvida para a análise de fósforo a partir da diluição do resíduo inorgânico da amostra com ácido clorídrico (IAL, 2008), o que não implica em interferências da matriz na análise espectrofotométrica, diferentemente da extração assistida por ultrassom que não proporciona a degradação total da amostra.

FIGURA 11 - TUBOS *FALCON* CONTENDO A AMOSTRA DE MELADO DE CANA E OS REAGENTES EXTRATORES (a) ANTES DA SONICAÇÃO E (b) APÓS O PROCESSO DE SONICAÇÃO REFERENTES A MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX CENTRÓIDE.



Tubo 1: 5,00 mL de HNO₃; **Tubo 2:** 5,00 mL de HCl; **Tubo 3:** 5,00 mL de H₂O; **Tubo 4:** 2,50 mL de HNO₃ e 2,50 mL de HCl; **Tubo 5:** 2,50 mL de HNO₃ e 2,50 mL de H₂O; **Tubo 6:** 2,50 mL de HCl e 2,50 mL de H₂O; **Tubo 7:** 1,67 mL HNO₃, 1,67 mL HCl e 1,67 mL H₂O.

FONTE: O autor (2018).

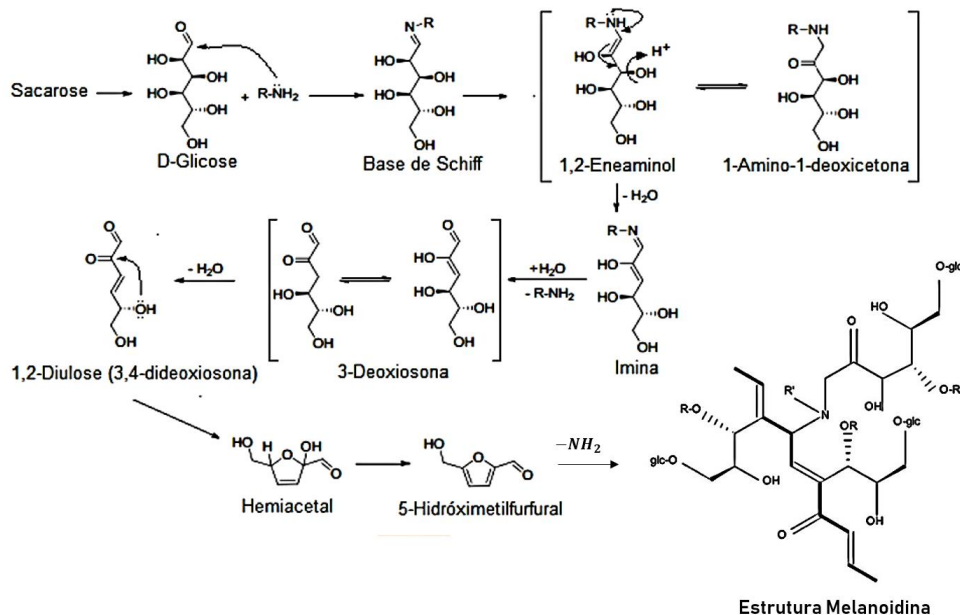
Com base na Figura 11 foi observado que quando a amostra está em contato com os reagentes extratores antes do processo de sonicação esta apresenta uma coloração amarelada, característica do melado de cana (Tubos *Falcon* 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e decorrente da presença de pigmentos oriundos da própria cana de açúcar ou do processamento e estocagem; já após o processo de sonicação ocorre uma mudança em sua coloração com um escurecimento acentuado da solução de extração, principalmente quando é adicionado ácido clorídrico puro (Tubo *Falcon* 2). Como o método de espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS não é seletivo em relação às substâncias que absorvem em determinado comprimento de onda, pode-se supor que, dependendo do tipo de ácido inorgânico utilizado e também da concentração adotada na extração assistida por ultrassom, poderia estar ocorrendo a formação de outras espécies químicas (moléculas, complexantes, radicais livres, entre outras) ou, ainda, que estas pudessem absorver na mesma faixa do espectro visível do complexo do fósforo com os íons molibdato e vanadato (420 nm), o que poderia estar resultando em taxas de

extração de P mais altas do que o esperado ($\cong 100,0\%$), como observa-se na Tabela 4 do Capítulo 4 para os ensaios 2, 3 e 6 do planejamento de misturas os quais envolvem a adição de ácido clorídrico puro, água ou sua mistura binária, respectivamente.

Para uma melhor compreensão do processo que ocorre antes e após a sonicação das amostras do planejamento de misturas aplicado para a extração do elemento P devem-se fazer algumas considerações sobre a origem da coloração característica do melado de cana. Existem quatro pigmentos responsáveis pela formação da cor na cana de açúcar, incluindo clorofilas, xantofilas, carotenos e antocianinas (THAMAPHAT et al., 2015). Estes podem ser encontrados em toda a estrutura morfológica da planta (WROLSTAD, 2005).

Contudo, ressalta-se que os corantes, encontrados nos produtos derivados da cana de açúcar, não são oriundos somente dos pigmentos naturais da planta, mas também de substâncias produzidas durante o processamento e armazenamento, como é o caso dos produtos da reação de Maillard (Figura 12) (PATON, 1992; GASPAR e LUCENA, 2009).

FIGURA 12 – ETAPAS DE FORMAÇÃO DA REAÇÃO DE MAILLARD.



FONTE: Adaptado de Lorenzo (2013) e Cammerer et al., (2012).

A partir dessa reação, ocorre a formação de melanoidinas (polimerização de HMF com grupos amina), que são componentes de alto peso molecular. À medida que o $^{\circ}$ Brix aumenta durante o processo de evaporação do caldo da cana, essas reações

prosseguem lentamente, mesmo à temperatura ambiente. Geralmente, essas substâncias contribuem com uma pigmentação mais acentuada, resultando em tons castanhos. Há também a formação de cor a partir da oxidação de compostos fenólicos, sendo esta contínua mesmo durante o processo de evaporação do caldo, embora este tipo de oxidação seja muito mais lento do que a oxidação enzimática (PATON, 1992; CLARKE e GODSHALL, 1988). É reconhecido na literatura que estes compostos são responsáveis pelo escurecimento do produto e absorvem em comprimentos de onda próximos a 420 nm (DUCAT, 2015).

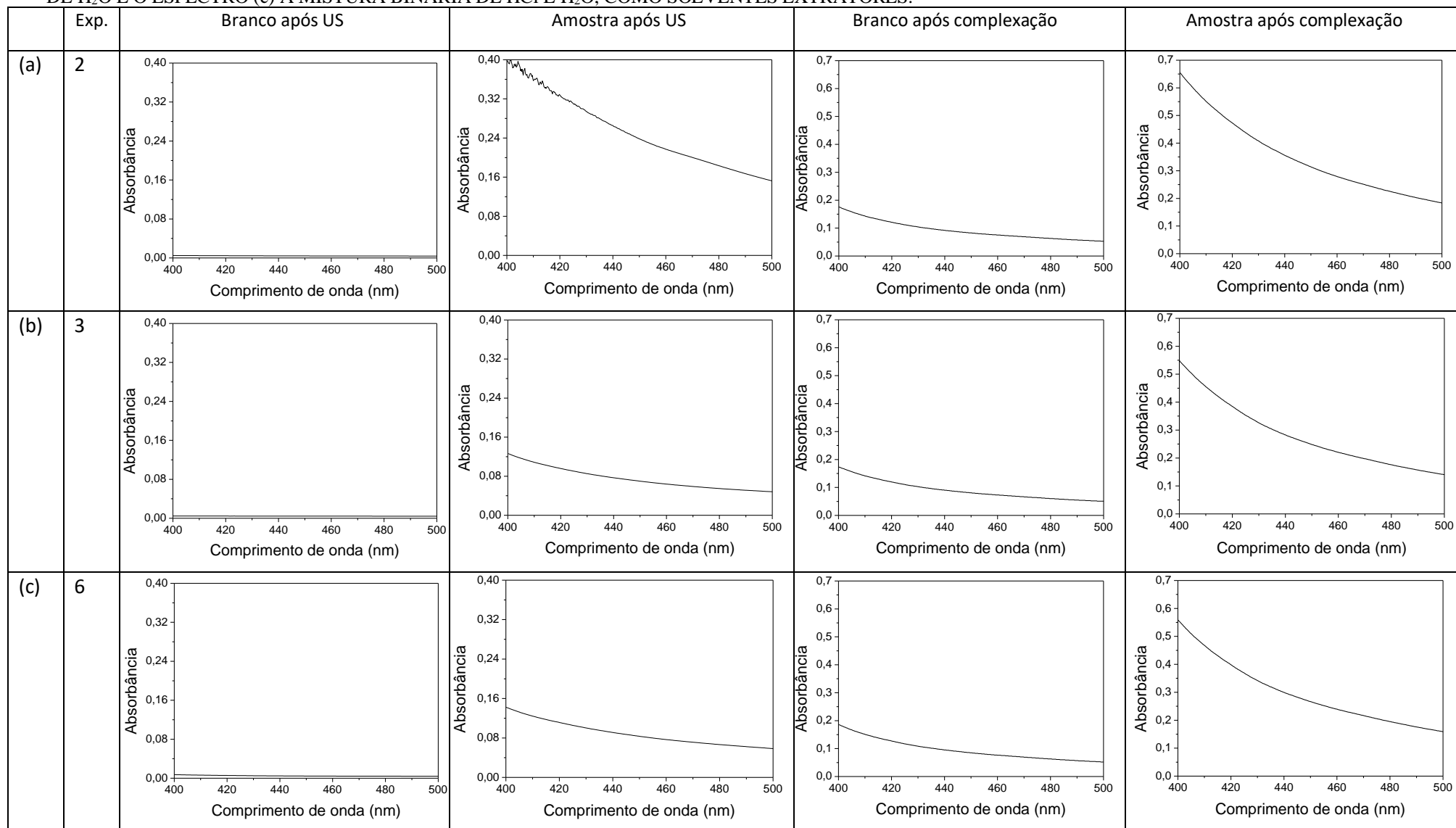
Assim, pode ser observado, que ligações entre o P e moléculas orgânicas, principalmente moléculas responsáveis pela pigmentação do melado, que absorvem na mesma faixa do espectro visível, podem vir a interferir no processo de extração do fósforo, dependendo de como este elemento está ligado a essas moléculas e de quais reagentes extratores estão sendo utilizados, já que alguns compostos se mostram insolúveis em determinados meios reacionais.

A partir da leitura das alíquotas das soluções preparadas nos experimentos do planejamento de misturas, foram obtidos os espectros dos brancos (solventes extratores puros e suas respectivas misturas) e das soluções das amostras após o processo de sonicação bem como das soluções das amostras após a complexação, na faixa do visível entre 400 e 800 nm, em um espectrofotômetro UV-VIS (APÊNDICE). As condições que foram analisadas inicialmente, foram as que continham HCl e H₂O (tubos *Falcon* 2 e 3, respectivamente), como solventes puros, e a mistura binária de HCl e H₂O (tubo *Falcon* 6), devido as mesmas apresentarem taxas de extração superiores à 100,0 %, de acordo com a Tabela 4 (Capítulo 4). Os espectros obtidos para essas condições são apresentados na Figura 13.

Com base na análise dos espectros dos experimentos 2, 3 e 6 foi verificado que a solução que continha somente HCl puro (tubo *Falcon* 2, Figura 11), foi a que apresentou maiores interferências na faixa do visível próxima a 420 nm, sendo também a amostra com uma coloração mais escura, em comparação com as demais amostras do planejamento de misturas, especialmente após o processo de sonicação (Figuras 11 e 13). Ressalta-se que o mecanismo de cavitação do banho ultrassônico auxilia na extração de compostos inorgânicos, fazendo com que ocorra a sedimentação do material particulado em suspensão, além de promover a quebra de ligações entre as espécies inorgânicas e a matriz orgânica presente na amostra. Essa quebra ocorre devido a produção de espécies altamente reativas, como H⁺ e HO⁻, na solução sonicada

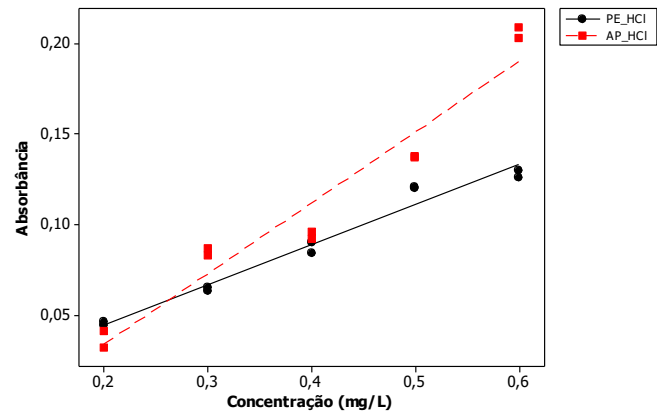
(NASCENTES, KORN e ARRUDA, 2001; TIWARI, 2015). Acredita-se que em relação ao experimento 2 (tubo *Falcon* 2, Figura 11) a sonicação, aliada as características da amostra de melado e do solvente extrator, esteja acelerando as reações de Maillard (Figura 12) com formação de pigmentos castanhos, que acentuam a coloração da solução de extração, aumentando assim o efeito de interferência de matriz para este experimento em particular.

FIGURA 13 – ESPECTROS DE UV-VIS PARA O P: O ESPECTRO (a) REFERE-SE À CONDIÇÃO DO PLANEJAMENTO USANDO HCl, O ESPECTRO (b) A UTILIZAÇÃO DE H₂O E O ESPECTRO (c) A MISTURA BINÁRIA DE HCl E H₂O, COMO SOLVENTES EXTRATOES.

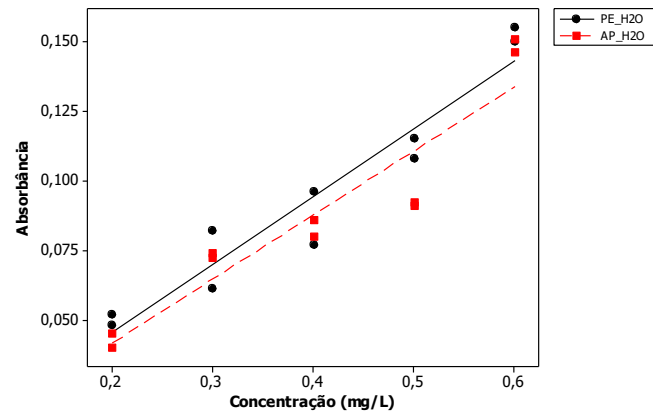


Para confirmar o efeito de matriz e a interferência decorrente das condições de extração adotadas nos experimentos 2, 3 e 6 foram construídas curvas analíticas de padrão externo com dissolução do padrão de fósforo nos solventes extratores destes experimentos e curvas de adição de padrão com dissolução da amostra de melado de cana nos mesmos solventes extratores. Ambas as curvas analíticas foram submetidas ao processo de sonicação e posteriormente foram calculados os intervalos de confiança para cada curva analítica de cada experimento. Na Figura 14 são ilustradas as curvas analíticas para os experimentos 2, 3 e 6 e na Tabela 9 são apresentados os dados da regressão linear e os intervalos de confiança das inclinações destas curvas analíticas.

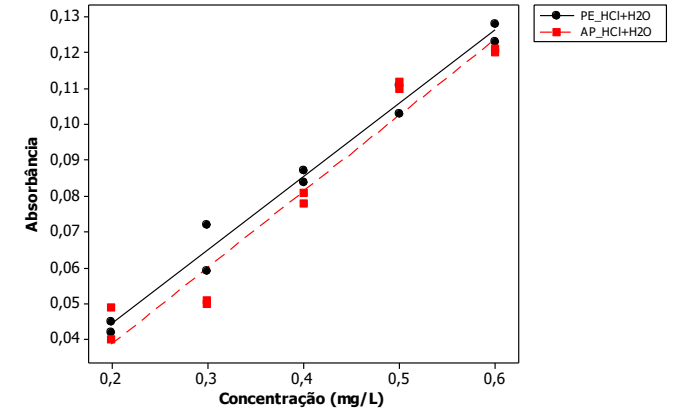
FIGURA 14 – CURVAS ANALÍTICAS PARA OS EXPERIMENTOS (a) 2, (b) 3 E (c) 6 DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS, EMPREGANDO A CALIBRAÇÃO POR PADRÃO EXTERNO EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR (●) E CALIBRAÇÃO POR ADIÇÃO DE PADRÃO (■).



(a)



(b)



(c)

TABELA 9 – DADOS DA APLICAÇÃO DE UMA REGRESSÃO LINEAR PARA O P EMPREGANDO AS CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO (PE), EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR E DE ADIÇÃO DE PADRÃO (AP) PARA AS CONDIÇÕES 2,3 E 6 DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS.

	Tipo de calibração	Equação da Retas	Regressão			
			<i>r</i>	<i>R</i> ²	<i>F</i> _{regressão} ^a	<i>p</i> - valor
Exp. 2	PE-HCl	A = 0,0001 - 0,223 (± 0,030) *	0,975	96,8%	277,30	0,000
	AP-HCl	A = 0,0448 - 0,392 (± 0,079) *	0,944	93,4%	129,13	0,000
Exp. 3	PE-H ₂ O	A = 0,0036 - 0,245 (± 0,054) *	0,964	92,2%	107,50	0,000
	AP-H ₂ O	A = 0,0045 - 0,230 (± 0,068) *	0,887	86,9%	60,55	0,000
Exp. 6	PE-(HCl+H ₂ O)	A = 0,0032 + 0,205 (± 0,021) *	0,999	98,1%	468,09	0,000
	AP-(HCl+H ₂ O)	A = 0,0038 - 0,212 (± 0,039) *	0,955	94,5%	154,93	0,000

*Intervalo de confiança para a inclinação da curva apresentado entre parênteses. ^a*F*_{crítico} (0,05;1,8) = 5,32;

A análise da Figura 14 e dos intervalos de confiança apresentados na Tabela 9 comprova a avaliação dos espectros da Figura 13 descrita anteriormente e demonstra a interferência da matriz na extração assistida por ultrassom do fósforo quando ácido clorídrico concentrado e misturas aquosas deste ácido iguais ou superiores a 50,0 % são utilizadas.

Em relação aos outros experimentos do planejamento de misturas observa-se que taxas de extração de fósforo mais próximas de 100,0 % são obtidas em misturas ternárias de ácido clorídrico, ácido nítrico e água (experimentos 7 a 9, Tabela 4 do Capítulo 4). A análise dos espectros obtidos nestes experimentos (mostrados no Apêndice) também sugere que esta composição de solvente extrator não apresenta interferências de matriz significativas quando comparadas com os experimentos 2, 3 e 6. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que sob condições ácidas (pH ≈ 4), o P inorgânico é moderadamente solúvel e, da mesma maneira que os fosfatos, o fósforo orgânico solúvel, pode ser dissolvido e hidrolisado. Isto indica que, com base no efeito de cavitação, os compostos orgânicos macromoleculares tendem a passar para um estado disperso (GONG et al., 2015; HE et al., 2017). Quando as forças de cavitação fazem com que ocorra a instabilidade da estrutura interna das macromoléculas do P orgânico e, conseqüentemente o enfraquecimento de suas forças de ligação, radicais livres como H⁺ e HO⁻ podem causar rupturas na estrutura dos compostos orgânicos e,

assim, oxidar e decompor macromoléculas de P orgânico em P inorgânico (GIFFORD et al., 2015; PEHKONEN e ZHANG, 2002; ZHANG et al., 2014). Entretanto, como o P pode ser encontrado, no caldo de cana, na forma de fosfatos (de forma majoritária), ácido fítico, fitatos entre outros, este pode vir a formar complexos insolúveis com outros metais (MARTINS, 2004).

Quirrenbach et al. (2009), enfatizam, ainda, que o ácido fítico, dependendo do valor de pH do meio reacional em que se encontra, possui um alto potencial quelante, o que faz com que este complexa os metais presentes em solução, impedindo, assim, a produção de espécies reativas de oxigênio, que são responsáveis pela destruição oxidativa em sistemas biológicos, dificultando, dessa forma, a quebra e ruptura de ligações entre as espécies inorgânicas e a matéria orgânica. Isso pode acarretar em interferências no processo de extração total desse elemento, sendo estas atribuídas a compostos corantes advindos de reações de complexação ou, ainda, das próprias moléculas ligadas ao P responsáveis pela pigmentação do melado de cana. Portanto, faz-se necessária que a extração assistida por ultrassom seja realizada em meio moderadamente ácido. Por outro lado, deve-se buscar uma condição de extração que ofereça a melhor razão entre eficiência e interferência da matriz, levando-se em consideração as características intrínsecas do método analítico adotado neste estudo para a detecção e quantificação do fósforo.

Sendo assim, após verificar como o P se comportava no processo de extração assistida por ultrassom, em relação ao solvente extrator, este elemento foi avaliado de forma individual, a partir de uma análise de variância (ANOVA) da regressão linear, em que foram realizados testes estatísticos de adequação dos modelos que melhor se ajustavam aos dados experimentais.

7.2 EXTRAÇÃO DE P A PARTIR DE UM PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX CENTRÓIDE

Após a obtenção das taxas de extração para o P pelo método espectrofotométrico do ácido vanadomolibdofosfórico e da avaliação de interferentes na amostra de melado de cana, foi verificado qual modelo matemático melhor se ajustava aos dados experimentais, através de uma Análise de Variância (ANOVA) de regressão linear. Os modelos testados foram o linear, o quadrático e o cúbico especial, como mostra a Tabela 10.

TABELA 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS MODELOS LINEAR, QUADRÁTICO E CÚBICO ESPECIAL NO NÍVEL DE 95% DE CONFIANÇA PARA O P.

Análise de Variância para o P								
<i>Modelos</i>	<i>SQ¹</i>	<i>gl²</i>	<i>QM³</i>	<i>F_{regressão}</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Raiz quadrada do QM</i>	<i>R² (%)</i>	<i>R²_{ajustado} (%)</i>
<i>Linear</i>	2174,0	2	1087,0	1061 ^a	0,008	10,12	75,19	68,10
<i>Quadrático</i>	2881,0	5	576,20	222,8 ^b	0,000	1,60	99,64	99,20
<i>Cúbico Especial</i>	2885,5	6	480,91	246,4 ^c	0,000	1,39	99,80	99,39

Testes de falta de ajuste para o P					
<i>Modelo Quadrático</i>	<i>SQ¹</i>	<i>gl²</i>	<i>QM³</i>	<i>F</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Erro residual</i>	10,34	4	2,585	-	-
<i>Falta de ajuste</i>	4,49	1	4,487	2,30 ^d	0,227
<i>Erro puro</i>	5,85	3	1,951	-	-
<i>Total Ajustado</i>	2891,35	9	-	-	-

¹SQ = Soma Quadrática; ² gl = graus de liberdade; ³ QM = Quadrado Médio; ^a $F_{crítico (0,05;2;7)} = 4,74$; ^b $F_{crítico (0,05;5;4)} = 6,26$; ^c $F_{crítico (0,05;6;3)} = 8,94$; ^d $F_{crítico (0,05;1;3)} = 10,1$ para a falta de ajuste.

A partir da análise dos dados pela ANOVA, foi possível verificar que os três modelos testados apresentam significância estatística (valores de $F_{regressão} > F_{crítico}$), com $p < 0,05$. Porém, o modelo linear apresentou baixos coeficientes de determinação ($R^2 = 75,19$ e $R^2_{ajustado} = 68,10$ %), demonstrando que há efeito dos resíduos para este modelo. Em contrapartida, os modelos quadrático e cúbico especial apresentaram coeficientes de determinação elevados (> 99 %). Contudo, quando se compara os valores de $F_{regressão}$ para esses dois modelos não é observada uma diferença significativa, podendo, assim, ser aplicado o modelo quadrático aos dados experimentais já que o modelo cúbico especial só tornaria a equação mais complexa.

Outro parâmetro avaliado foi a raiz quadrada do quadrado médio do resíduo, em que foi verificado que o modelo quadrático apresentou um valor mais baixo (1,60) em relação ao modelo linear, demonstrando que este possui um bom ajuste para o P. Visando avaliar a falta de ajuste do modelo, os resultados para o valor de F_{faj} do modelo quadrático foram gerados, conforme a Tabela 10, demonstrando que não há falta de ajuste, em um nível de 95 % de confiança, para este modelo, com valor de $F_{faj} < F_{crítico}$ ($p > 0,05$). Em vista disso, o modelo quadrático foi escolhido para descrever os dados experimentais.

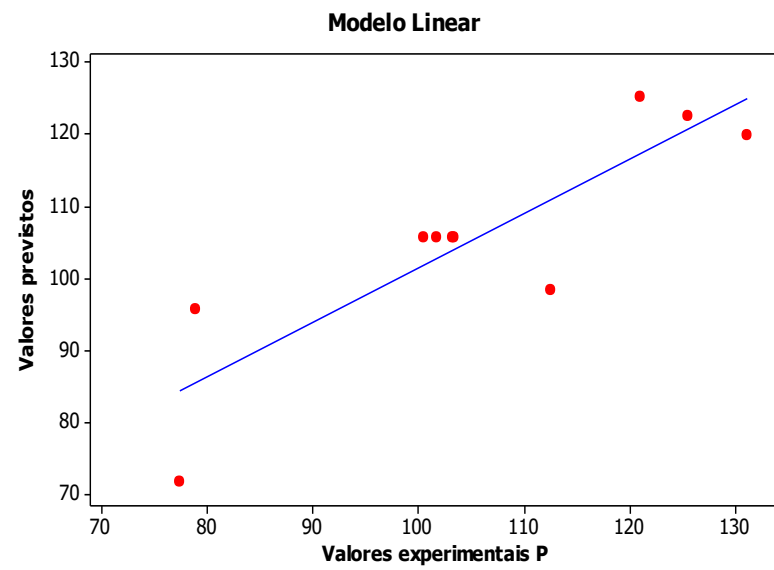
Para o P foi obtida, ainda, a equação que descreve o modelo quadrático ajustado, buscando-se determinar as condições ótimas de extração em relação ao modelo ajustado, para os três componentes da mistura (Equação 9, descrita no item 5.1 do Capítulo 5). O cálculo da equação de regressão indicou que há uma interação estatisticamente significativa entre sistemas de dois componentes e a equação gerada para o modelo quadrático está apresentada abaixo:

$$y_{(\% \text{ de extração})} = \mathbf{15,52} (\pm 0,319)x_1 + \mathbf{26,28} (\pm 0,319)x_2 + \mathbf{24,25} (\pm 0,319)x_3 - \mathbf{4,253} (\pm 0,276)x_1x_2 + \mathbf{1,923} (\pm 0,276)x_1x_3 - \mathbf{0,304} (\pm 0,276)x_2x_3 \quad \text{Equação 14}$$

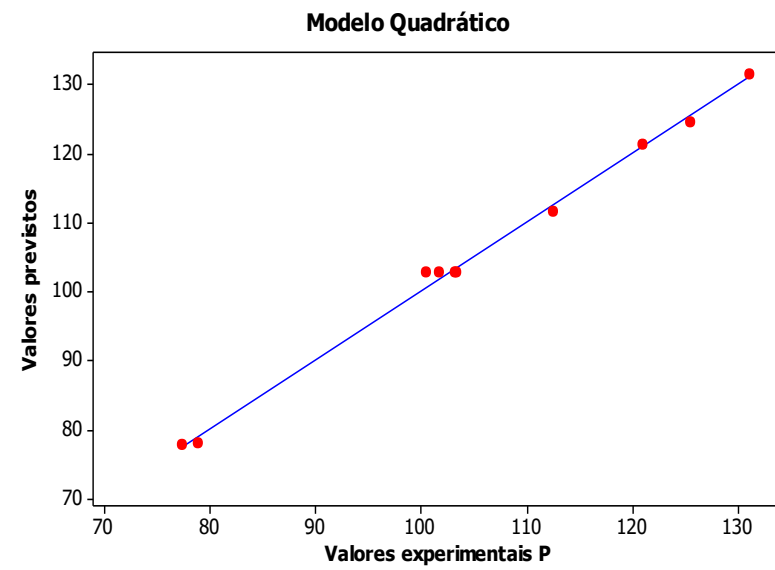
Sendo que os valores para x_1 , x_2 e x_3 representam os componentes individuais da mistura (HNO_3 , HCl e H_2O) e os valores entre parênteses correspondem aos intervalos de confiança dos coeficientes. A significância dos componentes da mistura foi avaliada pela aplicação de um *teste-t* e os pontos críticos, para cada variável, foram destacados em negrito. A partir dos pontos críticos é possível calcular os valores previstos para os modelos testados, sendo assim, estes foram então aplicados no método de regressão linear para avaliar o modelo estabelecido.

A partir da análise dos modelos matemáticos (linear e quadrático) e com base nos cálculos de regressão, foi realizada uma comparação entre os valores experimentais e os valores previstos, por meio dos gráficos de resíduos gerados (Figura 15).

FIGURA 15 - GRÁFICOS DE VALORES PREVISTOS *VERSUS* VALORES OBSERVADOS: (a) PARA O MODELO LINEAR E (b) PARA O MODELO QUADRÁTICO AJUSTADOS PARA O P.



(a)

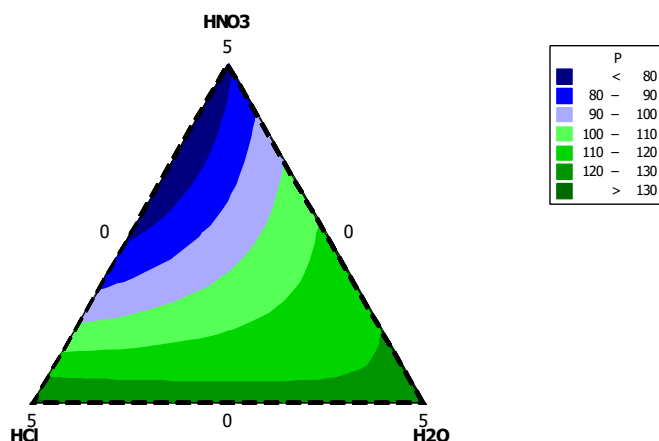


(b)

A comparação dos gráficos de resíduos, para os dados experimentais em relação aos dados previstos, mostrou que uma distribuição normal dos pontos foi observada para o modelo quadrático (Figura 14b); já para o modelo linear esta distribuição se apresentou de uma forma mais aleatória (Figura 14a). Com isso, a análise de resíduos indica que o modelo quadrático apresenta os pontos mais próximos à reta indicando um melhor ajuste dos dados quando comparado ao modelo linear.

Após a avaliação do modelo matemático ajustado, o gráfico de contorno foi gerado, com o intuito de se avaliar qual solvente extrator apresentava maior eficiência nas taxas de extração para o P, sendo estas expressas em porcentagem, de acordo com a Figura 16.

FIGURA 16 - GRÁFICO DE CONTORNO DE MISTURAS GERADO PELO AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO CONSIDERANDO OS VALORES DE TAXAS DE EXTRAÇÃO PARA P EM MELADO DE CANA.



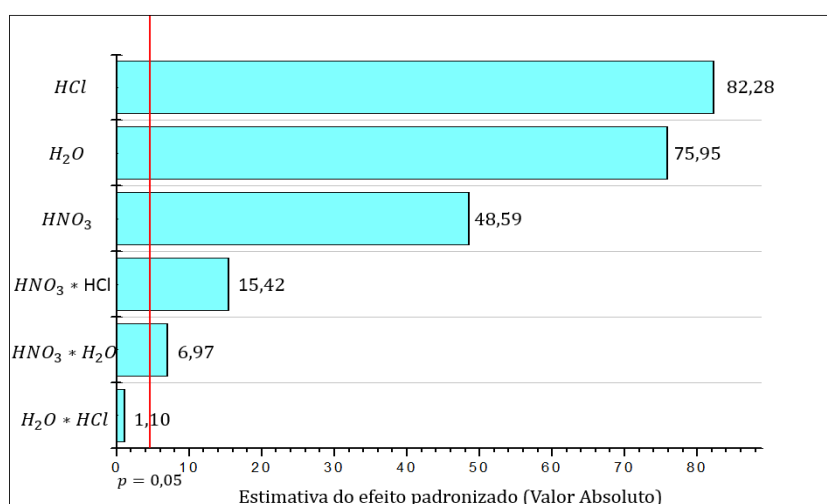
É possível observar na Figura 16, que existe uma relação entre os três componentes da mistura estudada, sendo que as taxas de extração, para o P, ficaram próximas a 100,0 %, com uma mistura ternária (região central do gráfico de contorno). Isso pode ocorrer devido ao fósforo ser um componente estrutural de macromoléculas, como ácidos nucleicos e fosfolipídios também podendo atuar na formação da sacarose, pela reação entre a glucose-1-fosfato com a frutose e, portanto, este metal deve estar fortemente ligado a matriz (ALEXANDER, 1973). Além disso, esse elemento pode ser encontrado, no caldo de cana, na forma de fosfatos, ácido fítico, nucleotídeos e fosfoproteínas. Sendo que quando o P está na forma de fosfato, tende a formar complexos insolúveis, ressaltando que os fosfatos inorgânicos são predominantes no melado de cana (MARTINS, 2004). Isso implica que para poder ser feita a quantificação desse

elemento em melado de cana é necessário o uso de solventes de maior reatividade para sua completa extração. Como já descrito anteriormente, taxas de extração superiores a 100,0 % foram observadas em alguns experimentos, as quais foram decorrentes de interferências da matriz.

Krug (2006) e Belter, Sajnóg e Barańkiewicz (2014), enfatizam que quando o metal está ligado fortemente à matriz de interesse, misturas de ácidos inorgânicos, podem reagir e formar produtos com uma maior reatividade, auxiliando na quebra dessa ligação. Os ácidos nítrico e clorídrico são os mais utilizados com essa finalidade, pois quando combinados, o caráter oxidante do ácido nítrico com o caráter complexante do ácido clorídrico, melhoram os rendimentos de extração. Isso corrobora com os resultados obtidos no neste estudo, em que foram obtidas taxas de extração para o P mais próximas a 100,0 % com misturas ternárias de solventes (HCl, HNO₃ e H₂O). Ressalta-se, ainda, que a água, presente nessa mistura, pode auxiliar na diminuição da viscosidade gerada entre a mistura dos ácidos inorgânicos concentrados, facilitando, assim, o processo de cavitação da amostra e aumentando a eficiência de extração do P.

Além disso, pela aplicação de um teste-*t* e pela análise do gráfico de Pareto (Figura 17) pôde ser feita a avaliação dos efeitos dos solventes puros e das misturas de solventes na extração de P pelo planejamento de misturas simplex centróide.

FIGURA 17 – GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO PARA O P.

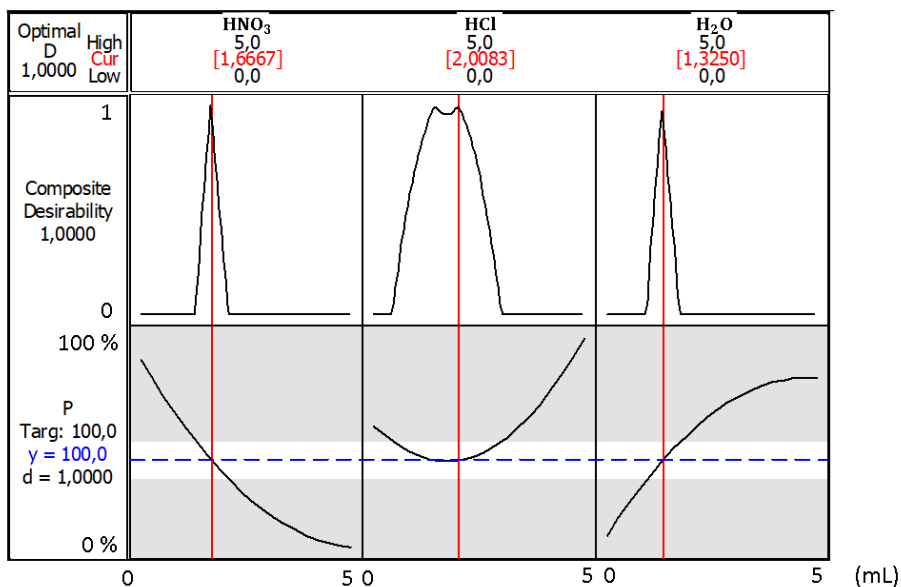


É perceptível que com a presença de HCl na mistura, há um aumento nas taxas de extração do fósforo quando comparado aos demais solventes extratores (Figura 17), fato este que pode estar relacionado com às propriedades complexantes desse ácido.

Contudo, o uso de apenas um solvente, principalmente o ácido clorídrico, pode levar a formação de compostos coloridos que causam interferências na determinação colorimétrica do fósforo como já descrito anteriormente. No que diz respeito ao termo referente ao efeito de interação entre H₂O e HCl foi observado que este não é estatisticamente significativo ($p > 0,05$), indicando que somente a mistura desses dois componentes não é importante para a extração do P em melado de cana. Já os efeitos de interação entre HNO₃ e H₂O e entre HNO₃ e HCl são significativos no nível de 95 % de confiança, indicando que a mistura desses componentes pode melhorar a eficiência de extração do elemento dentro da região experimental estabelecida.

Diante disso, foi gerado um perfil de desejabilidade individual para o P, com os valores aproximados, de forma a encontrar as melhores proporções do solvente extrator, com base na Equação 1, descrita no item 2.6, do Capítulo 2. Os perfis individuais de desejabilidade para o P são apresentados na Figura 18.

FIGURA 18 - PERFIL DOS VALORES PREVISTOS PARA A DESEJABILIDADE INDIVIDUAL DA OTIMIZAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS VARIÁVEIS DE MISTURA PARA O P.



Pela análise da Figura 18, é possível verificar que as condições ótimas de extração, que proporcionaram taxas de extração próximas a 100,0 %, foram obtidas quando se utilizou 1,67 mL de HNO₃, 2,00 mL de HCl e 1,30 mL de H₂O. Nessa condição, a desejabilidade máxima atingida para o P foi igual a 1.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, A. G. **Sugarcane physiology**. Amsterdam: Elsevier, 1973, 752 p.

BELTER, M.; SAJNÓG, A.; BARAKIEWICZ, D. Over a century of detection and quantification capabilities in analytical chemistry – Historical overview and trends. **Talanta**, v. 129, p.606-616, 2014.

CAMMERER, B.; CHODAKOWSKI, K.; GIENAPP, C.; WOHAK, L.; HARTWIG, A.; KROHL. Pro-oxidative effects of melanoidin–copper complexes on isolated and cellular DNA Eur. **Food Res Technol**, v. 234, p. 663–670, 2012.

CLARKE, M.A.; GODSHALL, M. A. eds. **Chemistry and Processing of Sugar beet and Sugarcane**. Chapter 13: The nature of colorants in sugarcane and beet sugar manufacture. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988, 186-207 p.

DUCAT, G., FELSNER, M. L., COSTA NETO, P. R. da., QUINÁIA, S. P. Development and *in house* validation of a new thermogravimetric method for water content analysis in soft brown sugar. **Food Chemistry**, v. 177, p.158-164, 2015.

GASPAR, E. M. S. M.; LUCENA, A. F. F.; Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. **Food Chemistry**. v. 114. p. 1576–1582. 2009.

GIFFORD, M.K., LIU, J., RITTMANN, B.E., VANNELA, R., WESTERHOFF, P. Phosphorus recovery from microbial biofuel residual using microwave peroxide digestion and anion exchange. **Water Res**. v. 70, p. 130–137, 2015.

GONG, C., JIANG, J., LI, D., TIAN, S. Ultrasonic application to boost hydroxyl radical formation during Fenton oxidation and release organic matter from sludge. **Sci. Rep**. v. 5, n. 2, p. 252–255, 2015.

HE, X.; ZHANG, T.; REN, H.; LI, G.; DING, L.; PAWLOWSKI, L. Phosphorus recovery from biogas slurry by ultrasound/H₂O₂ digestion coupled with HFO/biochar adsorption process. **Waste Management**, v. 60, p.219-229, 2017.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4ª ed. São Paulo, v. 1, 1020 p, 2008.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**, 6ª ed., Santa Maria: UFMS, p. 282, 2006.

LORENZO, G. A. **Análisis Inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado em alimentos**. 2013. 309f. Tese (Doutorado) – Universidade Complutense de Madrid, Madrid.

MARTINS, N. G. S. **Os fosfatos na cana-de-açúcar**. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba - SP, 2004.

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

PATON, N. H. The Origin of Colour in Raw Sugar. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, p. 8-17, 1992.

PEHKONEN, S.O., ZHANG, Q. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** v. 32, n. 1, p. 17–72, 2002.

QUIRRENBACH, H. R.; KANUMFRE, F.; ROSSO, N. D.; CARVALHO FILHO, M. A. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe (II) e Fe (III). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 29, n.1, p. 24-32, 2009.

THAMAPHAT, K.; GOODMAN, B. A.; LIMSUWAN, P.; SMITH, S. M. Rapid screening for anthocyanins in cane sugars using ESR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 171, p.123-127, 2015.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p.100-109, 2015.

WROLSTAD, R. E. **Handbook of food analytical chemistry**. New Jersey: Wiley Interscience, 2005.

ZHANG, T., FANG, C., LI, P., JIANG, R.F. Application of struvite process for nutrient recovery from anaerobic digesters of livestock wastewater. **Environ. Prot. Eng.** v. 40, n. 3, p. 29–42, 2014.

**CAPÍTULO 8. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO
ASSISTIDA POR ULTRASSOM NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P
EM MELADO DE CANA**

8.1 CURVAS ANALÍTICAS E LINEARIDADE

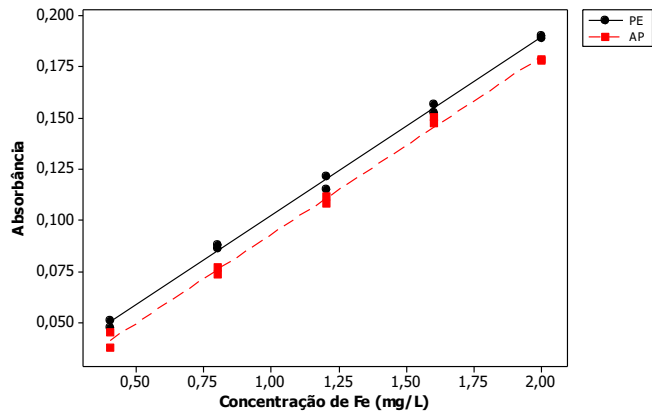
A quantificação de Fe e de Mn em melado de cana, empregando a técnica de F AAS, foi avaliada por dois métodos de padronização; já para Ca e Mg foram avaliados três métodos de padronização, devido a extração desses metais ocorrer em uma mistura de solventes. Sendo que a avaliação do P, pela técnica de espectrofotometria no UV-VIS, também foi realizada a partir da padronização do método pela mistura de solventes. Os métodos de padronização empregados nesse estudo foram os de: padrão externo em meio aquoso; por adição de padrão que consiste na dissolução dos padrões na matriz de melado de cana; e por padrão externo em meio aos solventes extratores pela adição dos solventes extratores otimizados pelo planejamento de misturas aos padrões metálicos, com posterior sonicação.

A aplicação dos métodos de padronização foi realizada para verificar se haviam interferências da matriz estudada, durante as análises espectrométricas. Em relação a linearidade, esta foi avaliada por testes estatísticos, em um nível de 95 % de confiança.

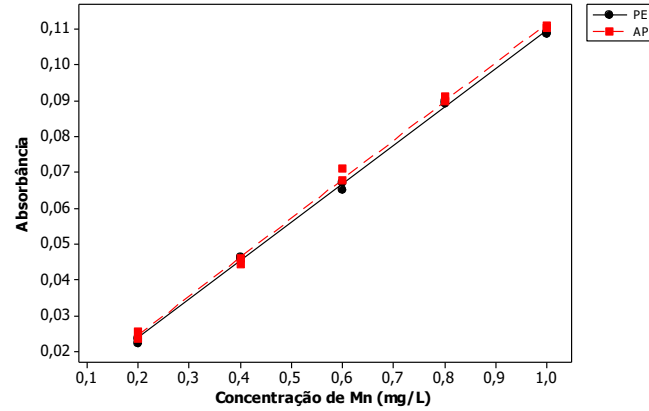
O método de padronização externa permite a análise de várias amostras do analito com a mesma curva de calibração, assim como, a análise do analito em uma ampla faixa de concentração. No que diz respeito a padronização por adição de padrão, esta é usada quando a matriz da amostra é mais complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando há dificuldade de encontrar uma matriz isenta da substância de interesse (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997). De acordo com Ribani et al. (2004), o método de padronização externa é realizado quando nenhum erro sistemático proveniente da matriz é suspeito, enquanto que o método de adição de padrão é aplicado para que ocorra a correção do efeito da matriz na quantificação do analito de interesse. O mesmo pode ser feito em relação aos solventes extratores.

As curvas analíticas de padrão externo (PE), de adição de padrão (AP) e de padrão externo em meio de solvente extrator (PE-MIS) para Fe, Mn, Mg, Ca e P são apresentadas na Figura 19.

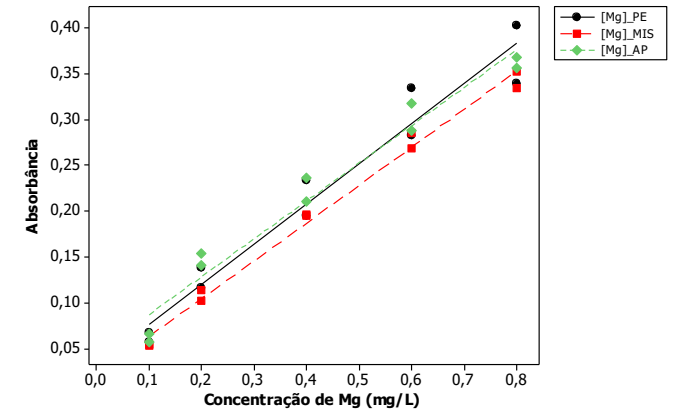
FIGURA 19 - CURVAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE (a) Fe, (b) Mn, (c) Mg, (d) Ca E (e) P, EMPREGANDO CALIBRAÇÃO POR PADRÃO EXTERNO (●), CALIBRAÇÃO POR ADIÇÃO DE PADRÃO (■) E CALIBRAÇÃO POR PADRÃO EXTERNO EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR (◆).



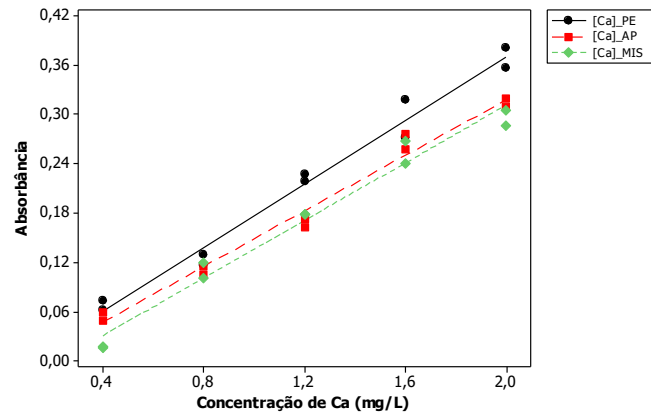
(a)



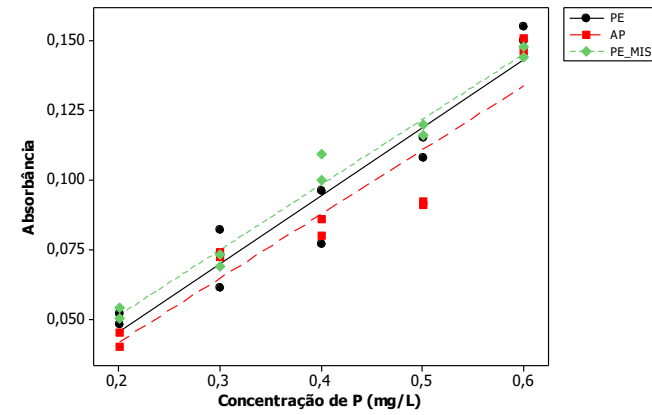
(b)



(c)



(d)



(e)

A partir da Figura 19, para a determinação de Fe, Mn, Mg, Ca e P, pôde ser observado que não houve diferenças entre as inclinações das curvas de padrão externo (PE), de adição de padrão (AP) e de padrão externo em meio de solvente extrator (PE-MIS) nos intervalos de concentrações investigados. Como método de confirmação, foi aplicada aos dados das curvas analíticas de cada elemento, a técnica de regressão linear em um nível de 95 % de confiança, para a obtenção da equação da reta e dos coeficientes de correlação e de determinação. Estes resultados são apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 - PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca e P EMPREGANDO AS CURVAS ANALÍTICAS DE PADRÃO EXTERNO, DE ADIÇÃO DE PADRÃO E DE PADRÃO EXTERNO EM MEIO DE SOLVENTE EXTRATOR

Parâmetros da Regressão Linear					
	<i>Faixa linear</i>	<i>Tipo de calibração</i>	<i>Equação da reta</i>	<i>r</i>	<i>R²</i>
Fe	0,4 – 2,0	PE ^a	$A = 0,0154 + 0,0870 \pm (0,0032) *$	0,998	99,8%
		AP ^b	$A = 0,0065 + 0,0868 \pm (0,0040) *$	0,997	99,6%
Mn	0,2 – 1,0	PE ^a	$A = 0,0022 + 0,1075 \pm (0,0032) *$	0,998	99,8%
		AP ^b	$A = 0,0028 + 0,1088 \pm (0,0038) *$	0,998	99,8%
Mg	0,1 – 0,8	PE ^a	$A = 0,0318 + 0,4400 \pm (0,0751) *$	0,958	95,3%
		AP ^b	$A = 0,0458 + 0,4130 \pm (0,0627) *$	0,966	96,2%
		PE-MIS ^c	$A = 0,0218 + 0,4140 \pm (0,0320) *$	0,991	99,0%
Ca	0,4 – 2,0	PE ^a	$A = 0,0168 - 0,1935 \pm (0,0214) *$	0,982	98,0%
		AP ^b	$A = 0,0211 - 0,1700 \pm (0,0177) *$	0,983	98,2%
		PE-MIS ^c	$A = 0,0399 - 0,1760 \pm (0,0215) *$	0,978	97,5%
P	0,2 – 0,6	PE ^a	$A = 0,0036 - 0,2450 \pm (0,0545) *$	0,964	92,2%
		AP ^b	$A = 0,0045 - 0,2300 \pm (0,0683) *$	0,886	86,9%
		PE-MIS ^c	$A = 0,0043 - 0,2350 \pm (0,0263) *$	0,987	97,9%

^aPE = Calibração por padrão externo, ^bAP = Calibração por adição de padrão e ^cPE-MIS = Calibração de padrão externo em meio de solvente extrator. *Intervalo de confiança para a inclinação da curva apresentado entre parênteses.

Pela análise dos dados da Tabela 11, é possível verificar, por meio da sobreposição dos intervalos de confiança dos coeficientes angulares das curvas analíticas de padrão externo (PE), de adição de padrão (AP) e de padrão externo em meio de solvente extrator (PE-MIS) que não há efeito de matriz na quantificação de todos os elementos avaliados. Dessa forma, a quantificação de Fe, Mn, Mg, Ca e P pode

ser feita a partir da padronização externa em meio aquoso, pois esta oferece vantagens em relação aos outros métodos de calibração, permitindo a análise de mais de uma amostra por meio de uma única curva analítica, além de abranger uma ampla faixa de concentração (HARVEY, 2000).

Também foi verificado, para o método de padrão externo, que os valores de coeficiente de correlação linear (r) variaram de 0,958 a 0,998, indicando uma possível relação linear entre a absorbância e a concentração dos elementos, respectivamente. Em relação ao coeficiente de determinação (R^2), este demonstrou que entre 92,2 a 99,8% dos dados experimentais são explicados pelo modelo linear, sendo que o restante da variação pode ser atribuído aos resíduos (FREIRE et al., 1999).

Ainda, para verificar se os resultados foram linearmente proporcionais à concentração do analito, foi realizado o estudo de linearidade das curvas analíticas de padrão externo (PE) pela aplicação da análise de regressão linear simples as curvas analíticas no nível de 95 % de confiança, conforme a Tabela 12.

TABELA 12 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA LINEARIDADE DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P, NO NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%.

	Tipo de calibração	Regressão		Falta de ajuste	
		$F_{regressão}^a$	$p - valor$	F_{faj}^b	$p - valor$
Fe	PE	3888,30	0,000	0,62	0,630
Mn	PE	5854,53	0,000	4,45	0,071
Mg	PE	182,23	0,000	0,46	0,720
Ca	PE	433,17	0,000	0,72	0,583
P	PE	107,50	0,000	1,67	0,287

^a $F_{crítico (0,05;1,8)} = 5,32$ para a regressão; ^b $F_{crítico (0,05;3,5)} = 5,41$ para a falta de ajuste.

Os resultados da análise de regressão linear (Tabela 12) sugeriram que a regressão é significativa (valores de $F_{regressão} \gg F_{crítico}$, com $p < 0,05$) indicando que os modelos gerados pelos dados das curvas analíticas de padrão externo possuem uma relação linear entre a concentração e a absorbância dos elementos investigados (NATA, 2018). Para verificar se o modelo linear se ajustava aos dados experimentais, também foi aplicado um teste de falta de ajuste (F_{faj}), no nível de 95 % de confiança, em que os valores de $F_{faj} < F_{crítico}$ com $p > 0,05$, sugerindo que a regressão linear é significativa

para as curvas analíticas estudadas e que não há falta de ajuste do modelo linear. Dessa forma, pode-se sugerir que as curvas analíticas de padrão externo de todos os elementos estudados apresentam linearidade na faixa de concentração investigada. Também para avaliar se as curvas analíticas passam pela origem, foram construídos intervalos de confiança para os coeficientes (intercepto e inclinação) no mesmo nível de confiança, a partir de um *teste-t*, para todos os elementos.

Com relação ao coeficiente linear, para Fe e Mn, os resultados dos testes estatísticos indicam que o coeficiente é significativo com valores de $t_{calculado} > t_{crítico}$, e $p < 0,05$ ($t_{calculado} = 2,41$ com $p = 0,042$ para Mn; e $t_{calculado} = 8,34$ com $p = 0,000$ para o Fe; $t_{crítico(0,025;8)} = 2,31$). Já para Mg, Ca e P, os resultados dos testes estatísticos indicam que este coeficiente não é significativo, com valores de $t_{calculado} < t_{crítico}$ e $p > 0,05$ ($t_{calculado} = 1,98$ com $p = 0,083$ para Mg; $t_{calculado} = 1,36$ com $p = 0,211$ para o Ca e $t_{calculado} = 0,36$ com $p = 0,729$ para o P; $t_{crítico(0,025;8)} = 2,31$), indicando que as curvas analíticas passam pela origem ($a = 0$).

Já o coeficiente angular foi significativo para todas as curvas analíticas analisadas, em que valores de $t_{calculado} > t_{crítico}$, com $p < 0,05$ ($t_{calculado} = 76,51$ para Mn, $t_{calculado} = 62,36$ para o Fe, $t_{calculado} = 13,50$ para o Mg, $t_{calculado} = 20,81$ para o Ca e $t_{calculado} = 10,37$ para o P; com $t_{crítico(0,025;8)} = 2,31$ e $p = 0,000$ para todos os elementos, respectivamente).

8.2 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Para avaliar se as metodologias desenvolvidas poderiam ser aplicadas para a determinação de Fe, Mn, Mg, Ca e P em amostras de melado de cana com baixas concentrações desses analitos, foram calculados os limites de detecção e de quantificação, sendo que estes parâmetros também estão relacionados com a sensibilidade do método. Sendo assim, a concentração mínima do analito que pode ser detectada pelo equipamento sem necessariamente quantificar é denominada de LD, enquanto que, o LQ representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada (RIBANI et al., 2004; BRITO et al., 2003).

Para estimar os valores de LD e de LQ, foi usado o método da curva analítica, utilizando como s o desvio padrão de dez brancos, conforme as Equações 5 e 6, apresentadas no item 3.9.2 do Capítulo 3. Os resultados são apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 - LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO PARA Fe, Mn, Mg, E Ca EMPREGANDO A TÉCNICA DE F AAS E DE P PELA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS.

Métodos de Preparo de Amostra		Fe	Mn	Mg	Ca	P
<i>Extração Assistida por Ultrassom</i>	<i>LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	0,266	0,284	0,037	0,282	0,296
	<i>LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	0,805	0,861	0,114	0,854	0,898
<i>Digestão Assistida por Micro-ondas</i>	<i>LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	1,720	0,362	1,395	0,680	1,775
	<i>LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	5,213	1,097	4,228	2,061	5,379

De acordo com a Tabela 13, os valores de LD e de LQ foram relativamente baixos para a determinação de Fe, Mn, Mg, Ca e P pelo método de extração assistida por ultrassom em relação ao método de referência (digestão assistida por micro-ondas), respectivamente. Isso indica que os métodos de extração assistida por ultrassom podem ser considerados adequados para a determinação desses elementos, em amostras de melado de cana e que apresentam uma boa exatidão e precisão mesmo em baixos níveis de concentração, além de também apresentarem uma maior sensibilidade quando comparados ao método de referência.

Andolfatto (2016) obteve valores de LD de $0,250 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Fe, $0,167 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mn e $10,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mg e LQ de $1,00 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Fe, $0,583 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mn e $20,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mg em amostras de melado de cana utilizando a amostragem em suspensão como método de preparo de amostra. Com isso, foi verificado que os valores obtidos nesse estudo estão próximos ao relatado na literatura para o Fe e abaixo do estimado por Andolfatto (2016) para o Mg na mesma matriz.

Santos et al. (2019) fizeram uso da extração assistida por ultrassom para a determinação de metais em açúcar mascavo. Os autores obtiveram valores de LD de $0,620 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mn, $0,890 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Fe, $116,8 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Ca e de $2,60 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mg e LQ de $2,10 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mn, $3,00 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Fe, $389,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Ca e $9,00 \mu\text{g g}^{-1}$ para o Mg. Ferreira (2016), também utilizou o método de extração assistida por ultrassom, para a determinação de Fe, na mesma matriz, obtendo valores de LD de $0,717 \mu\text{g g}^{-1}$ e LQ de $2,40 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Pode-se afirmar, assim, que os métodos de extração assistida por ultrassom desenvolvidos se mostram adequados para a determinação de elementos em amostras com altos teores de açúcares. Isso pode ser explicado devido a estes métodos de preparo de amostras utilizarem um volume de solventes reduzido em comparação com os métodos convencionais de extração e, conseqüentemente, acarretar na diminuição de contaminantes na amostra.

8.3 PRECISÃO

Para garantir a confiabilidade dos resultados, realizou-se um estudo de precisão para os métodos otimizados de extração assistida por ultrassom. Este parâmetro foi avaliado por estimativas de repetitividade e de precisão intermediária, expressas por desvios padrão relativos (DPR (%)) e pelo valor Horrat. Os resultados para o estudo de precisão são apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 - RESULTADOS DO ESTUDO DA PRECISÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.

	Repetitividade DPR (%)	DPR (%) Recomendado^a	Precisão Intermediária	Valor Horrat	Valor Horrat Recomendado^b
<i>Fe</i>	0,73	11	1,10	0,11	1,3
<i>Mn</i>	1,47	11	2,11	0,19	1,3
<i>Mg</i>	0,45	11	0,44	0,07	1,3
<i>Ca</i>	0,71	11	1,51	0,26	1,3
<i>P</i>	1,06	11	0,87	0,07	1,3

^aDPR (%) e ^bvalor de Horrat recomendado pela AOAC (2012) de acordo com a concentração determinada do analito.

Conforme a Tabela 14, para a estimativa de repetitividade, os valores encontrados para o DPR (%) foram considerados apropriados (< 11%), visto que foram inferiores ao valor recomendado pela AOAC (AOAC, 2012). Em relação a precisão intermediária, como os valores de Horrat encontrados foram menores que 1,3, então pode-se dizer que os métodos de preparo de amostra por extração assistida por ultrassom, apresentam precisão adequada para a determinação de Fe, Mn, Mg, Ca e P em amostras de melado de cana.

Andolfatto (2016) avaliou a precisão, em amostras de melado de cana, fazendo uso da amostragem em suspensão como método de preparo de amostra, para a determinação de Fe, Mn e Mg, considerando os desvios padrão relativos (DPR %) em dois níveis de concentração distintos. Os valores de DPR % variaram de 0,95 a 0,96 % para o Mn, de 0,41 a 1,04 % para o Fe e de 1,26 a 2,30 % para o Mg, na faixa de concentração investigada, sendo menores do que os valores recomendados de 7,3 e 5,3 %, respectivamente.

Santos et al. (2019) avaliaram a precisão do método de extração assistida por ultrassom, em amostras de açúcar mascavo, por meio da repetitividade e da estimativa da precisão intermediária pelos desvios padrão relativos (DPR%) e pelo cálculo do valor Horrat. Os valores de DPR % variaram entre 0,63 a 0,85 % para o Mg, de 3,49 a 4,10 % para o Ca, de 1,99 a 3,65 % para o Fe e de 5,16 a 5,74 % para o Mn, sendo que as amostras foram classificadas entre claras e escuras, na faixa de concentração investigada. Os valores obtidos para DPR % foram menores do que o recomendado na literatura, sendo estes de 5,3 e 7,3 %. Os valores de Horrat, calculados para todos os metais, também ficaram abaixo do valor máximo permitido ($< 1,3$), assim como a precisão intermediária ($< 10\%$).

Com isso, foi possível verificar que os valores encontrados nesse trabalho, para avaliar a precisão da extração assistida por ultrassom, estão condizentes com os relatados na literatura, na faixa de concentração do analito investigada.

8.4 EXATIDÃO

A exatidão dos métodos de extração assistida por ultrassom foi avaliada por meio da comparação com o método de referência (extração assistida por micro-ondas), aplicando-se um *teste-t* pareado no nível de 95% de confiança. Na Tabela 15 são apresentadas as médias das concentrações e os desvios padrão de Fe, Mn, Mg e Ca determinados nas amostras de melado de cana por F AAS e de P por espectrofotometria UV-VIS e na Tabela 16 são apresentados os resultados para o estudo de exatidão.

TABELA 15 – CONCENTRAÇÕES MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA OBTIDOS PELA APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E DE DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.

	Concentração Média mg g ⁻¹ ± Desvio Padrão									
	Fe		Mn		Mg		Ca		P	
	^a EAU	^b dMO	EAU	dMO	EAU	dMO	EAU	dMO	EAU	dMO
M 08	0,025±0,000	0,025±0,000	0,011±0,000	0,010±0,000	0,690±0,000	0,755±0,016	0,826±0,016	0,814±0,006	0,058±0,000	0,058±0,000
M 14	0,060±0,001	0,059±0,000	0,011±0,000	0,010±0,000	0,370±0,011	0,399±0,007	0,444±0,001	0,451±0,002	0,039±0,000	0,042±0,000
M 25	0,063±0,000	0,065±0,000	0,023±0,000	0,022±0,000	0,536±0,006	0,544±0,007	0,286±0,003	0,337±0,001	0,045±0,001	0,047±0,000
M 28	0,029±0,000	0,032±0,000	0,002±0,000	0,002±0,000	1,130±0,032	1,113±0,037	1,746±0,004	1,769±0,009	0,075±0,003	0,073±0,000
M 29	0,053±0,000	0,051±0,002	0,023±0,000	0,022±0,000	0,812±0,016	0,837±0,021	0,429±0,000	0,441±0,005	0,034±0,000	0,035±0,000

^aEAU = Extração assistida por ultrassom; ^bdMO = Digestão assistida por micro-ondas.

TABELA 16 - RESULTADOS DO *TESTE-t* PAREADO PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.

Extração Assistida por Ultrassom <i>versus</i> Digestão Assistida por Micro-ondas		
	$t_{calculado}$	$p - valor$
<i>Fe</i>	0,79	0,452
<i>Mn</i>	2,12	0,063
<i>Mg</i>	2,21	0,054
<i>Ca</i>	2,19	0,056
<i>P</i>	1,51	0,166

$t_{crítico (0,025;8)} = 2,31$

Os resultados do *teste-t* pareado (Tabela 16) sugerem que não há diferenças estatisticamente significativas entre os métodos propostos e o método de referência para a determinação de Fe, Mn, Mg, Ca e P em um intervalo de confiança de 95%, em que valores de $t_{calculado} < t_{crítico}$ e $p > 0,05$. Com isso, pode-se dizer que não existem diferenças na exatidão dos métodos de preparo de amostra analisados e que os mesmos não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos.

REFERÊNCIAS

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

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F**, 2012.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. de A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégias e Discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.

FERREIRA, M. A. **Otimização e validação de metodologias analíticas alternativas para a determinação de Mn, Zn, Mg e Fe em açúcar mascavo utilizando a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)**. Guarapuava, 2016. 112f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, Paraná, 2016.

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

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. 1.ed. McGraw Hill: Boston, 2000. p.109-110.

NATA. **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**, 2018, 31p.

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

SANTOS, J. M. dos.; ANDRADE, J. K. de.; GALVÃO, F.; FELSNER, M. L. Optimization and validation of ultrasound-assisted extraction for the determination of micro and macro minerals in non-centrifugal sugar by F AAS. **Food Chemistry**, v. 292, p.66-74, 2019.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, 2. ed. Wiley: New York, 1997, cap. 15.

**CAPÍTULO 9. APLICAÇÃO DE UMA ANÁLISE DE COMPONENTES
PRINCIPAIS (ACP) EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA**

9.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

Para verificar se havia uma correlação entre os teores de Fe, Mn, Ca, Mg e P nas amostras de melado de cana, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP), considerando as variáveis: quantidade de amostras, fabricante e região geográfica. A ACP é uma técnica matemática de análise multivariada que permite transformar um conjunto de variáveis correlacionáveis em outro conjunto não correlacionável (Componentes Principais), resultando na combinação linear do conjunto inicial e, com isso, explicar quais variáveis são mais relevantes por meio de funções matemáticas (REIS, 1997; HONGYU, SANDANIELO e OLIVEIRA JUNIOR, 2015). Assim, para o emprego da ACP foi realizada a aplicação das metodologias desenvolvidas, nesse trabalho, em 20 amostras de melado de cana e na Tabela 17 são apresentadas as médias das concentrações e os desvios padrão dos elementos analisados.

TABELA 17 – CONCENTRAÇÕES MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA OBTIDOS NA APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.

Amostras	Concentração Média mg 100g ⁻¹ ± Desvio Padrão				
	Fe	Mn	Mg	Ca	P
M 01	0,643±0,035	0,438±0,007	70,338±0,231	38,840±2,005	0,262±0,003
M 02	5,056±0,006	0,881±0,000	37,982±0,646	24,671±0,080	0,277±0,002
M 03	1,908±0,014	1,303±0,003	58,669±0,469	63,704±1,576	0,628±0,005
M 04	0,959±0,012	0,672±0,006	18,854±0,146	14,411±0,257	0,167±0,015
M 05	0,750±0,005	0,222±0,004	19,928±0,563	15,888±0,660	0,155±0,002
M 06	1,871±0,010	1,311±0,000	87,975±2,786	51,229±0,205	0,225±0,002
M 09	1,674±0,032	0,209±0,008	8,149±0,126	13,630±0,190	0,128±0,004
M 11	17,70±0,122	3,437±0,014	138,12±0,792	54,755±0,989	0,808±0,001
M 12	3,648±0,013	0,872±0,000	39,551±1,247	46,580±0,679	0,261±0,008
M 13	3,645±0,006	0,871±0,004	60,583±0,683	15,763±0,539	0,550±0,011
M 15	7,886±0,018	< LQ ^a	6,919±0,149	5,205±0,185	0,073±0,007
M 16	8,118±0,010	0,196±0,009	12,502±0,176	3,178±0,248	0,048±0,008
M 17	6,067±0,017	1,752±0,024	75,995±0,356	79,139±0,621	0,658±0,005
M 19	1,474±0,005	0,406±0,006	60,330±0,262	7,850±0,165	0,420±0,005

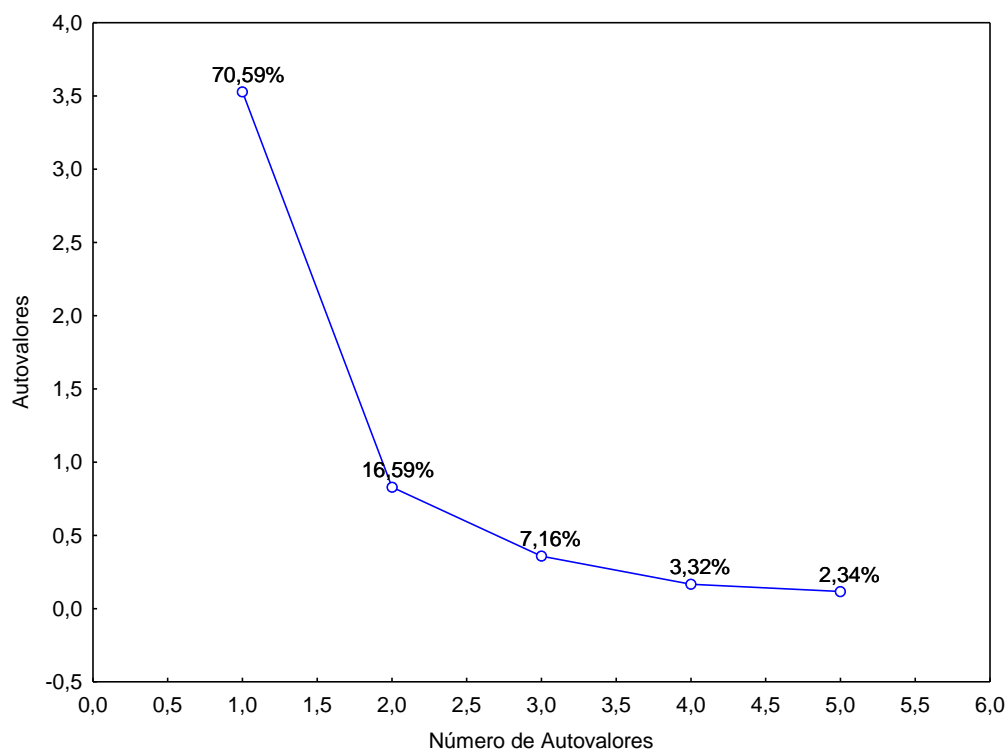
TABELA 17 – CONTINUAÇÃO

Amostras	Concentração Média mg 100g ⁻¹ ± Desvio Padrão				
	Fe	Mn	Mg	Ca	P
M 20	5,293±0,011	0,604±0,009	12,948±0,334	14,977±0,252	0,155±0,009
M 21	3,537±0,006	< LQ ^a	12,137±0,284	20,397±0,947	0,069±0,006
M 22	71,13±0,130	1,973±0,005	100,83±2,622	52,255±0,737	0,454±0,002
M 24	2,788±0,004	0,626±0,004	54,866±0,391	19,976±0,956	0,236±0,004
M 27	5,337±0,051	0,526±0,007	45,531±0,392	23,146±0,118	0,289±0,003
M 30	3,655±0,009	0,696±0,006	46,228±0,517	10,896±0,054	0,288±0,003

^a Concentração não detectada.

A partir da Análise dos Componentes Principais foram encontrados 5 CP's (Componentes Principais) sendo que apenas dois destes apresentaram autovalores > 1 , explicando 87,18% da variância encontrada entre as variáveis (Figura 20). Geralmente é adotado o critério de Kaiser (1958) para selecionar os CP's; estes são selecionados com o intuito de explicarem a maior parte da variação do conjunto de dados a partir do *Scree Plot* (Figura 20), que é a representação gráfica dos autovalores λ_i , referente a matriz de correlação, em que os dados são ordenados de forma decrescente. Por este critério, procura-se manter a primeira componente principal após a “formação de cotovelo”, que representa um decréscimo de importância em relação à variância total (CATTELL, 1966; SAVEGNAGO et al., 2011).

FIGURA 20 - GRÁFICO *SCREE PLOT* DOS PERCENTUAIS DAS VARIÂNCIAS OBTIDOS PELAS COMPONENTES PRINCIPAIS DOS TEORES DE MINERAIS NAS AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.



Pela aplicação da ACP também foi possível obter a matriz de correlação entre os Componentes Principais e as variáveis (cargas marcadas). Na tabela 18 são apresentadas, em negrito, as correlações com maior variância entre a variável e o componente principal (com carga $> 0,7$) de acordo com o critério adotado por Jolliffe (1973), em que se descarta o número de componentes principais cuja variância é inferior a 0,7 ($\lambda_i < 0,7$).

TABELA 18 – ACP CORRELACIONADA COM AS CARGAS MARCADAS PARA CADA VARIÁVEL EM RELAÇÃO AOS TEORES MÉDIOS DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.

	Carga dos Componentes Principais	
	<i>Fator 1</i>	<i>Fator 2</i>
<i>P</i>	-0,886921	-0,267879
<i>Fe</i>	-0,530187	0,841783
<i>Mn</i>	-0,950796	-0,013789
<i>Mg</i>	-0,931114	-0,033318
<i>Ca</i>	-0,824213	-0,199683

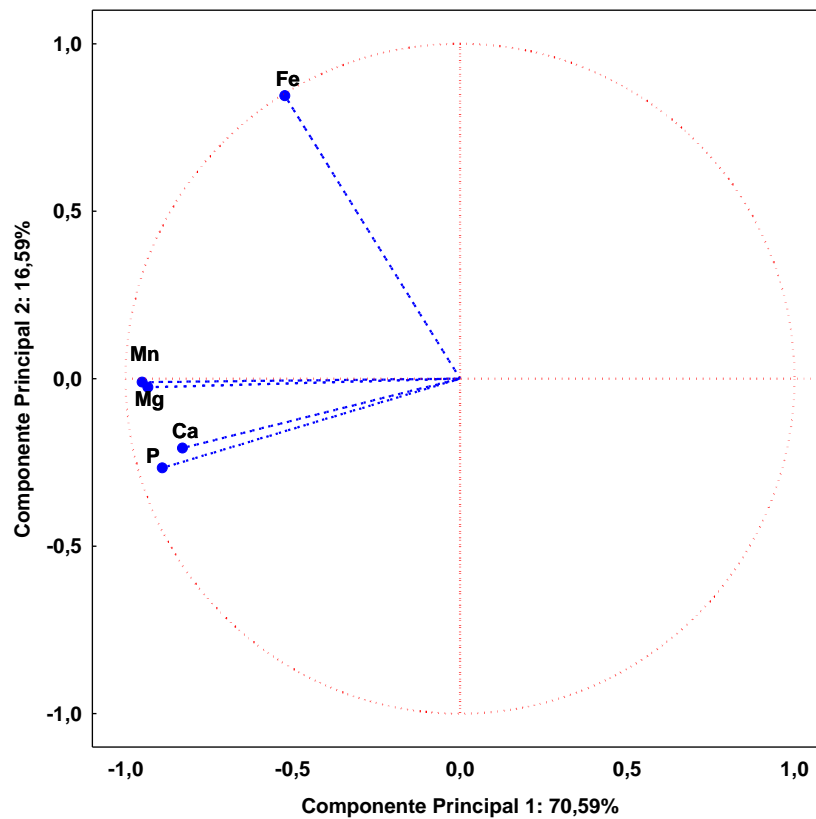
TABELA 19 – MATRIZ DE CORRELAÇÃO ENTRE OS AUTOVALORES PARA Fe, Mn, Mg, Ca E P EM RELAÇÃO AOS TEORES MÉDIOS DE CADA ELEMENTO.

CP's	Autovalores	% de variância explicada	Autovalores Cumulativos	% cumulativo de variância
1	3,518040	70,36079	3,518040	70,3608
2	0,821531	16,43063	4,339571	86,7914
3	0,374489	7,48977	4,714060	94,2812
4	0,167294	3,34589	4,881354	97,6271
5	0,118646	2,37292	5,000000	100,0000

Dessa forma, pela análise das Tabelas 18 e 19 foi possível verificar que o Componente Principal 1 (CP1) explicou 70,36 % da variância, correlacionando as variáveis P, Mn, Mg e Ca. Já o Componente Principal 2 (CP2) explicou 16,43 % e apresentou como única variável importante o Fe, com escores para as demais variáveis próximos ao eixo zero.

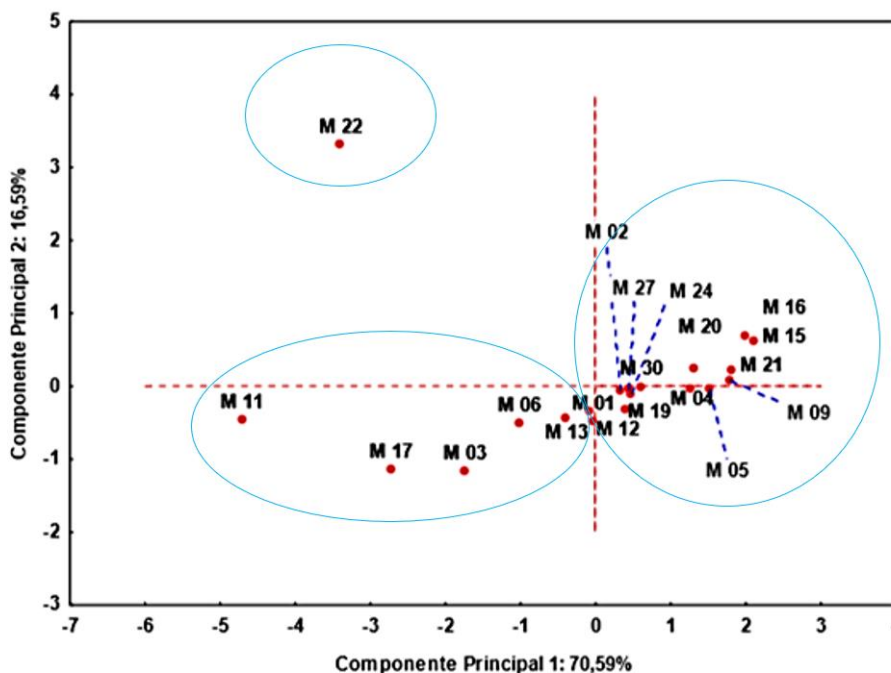
As Figuras 21 e 22 apresentam o gráfico de pesos e o gráfico de escores, para as componentes principais CP1 e CP2, respectivamente.

FIGURA 21 - GRÁFICO DE PESOS DAS VARIÁVEIS OBTIDO PELA ANÁLISE DOS TEORES MÉDIOS DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.



Pela sobreposição de variáveis, pôde-se verificar que todas as variáveis estão diretamente correlacionadas pela CP1, enquanto as variáveis Mn, Mg, Ca e P estão correlacionadas negativamente com o Fe em relação a CP2 conforme foi constatado, inicialmente, pela matriz de cargas marcadas (Tabela 18).

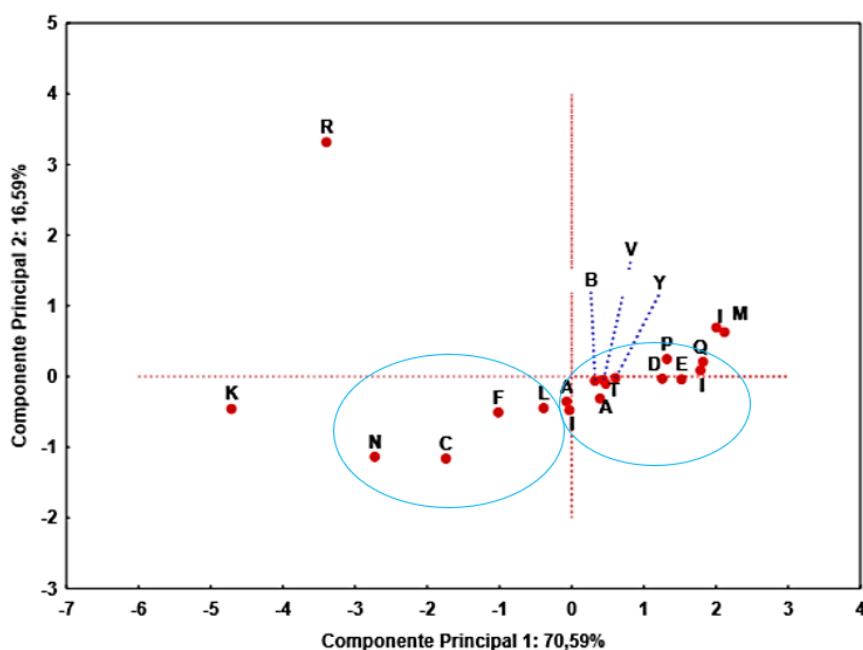
FIGURA 22 - GRÁFICO DE ESCORES DA CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DE Fe, Mn, Mg., Ca E P E OS TEORES MÉDIOS DESSES ELEMENTOS EM AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.



A partir da análise conjunta das Figuras 21 e 22, pôde ser verificado que as amostras M 03, M 17, M 11, M 06, M 01, M 12 e M 13, localizadas no quadrante negativo de X e de Y se caracterizaram por elevados teores de Ca e P. No quadrante positivo de X e negativo de Y localizaram-se as amostras M 19, M 04, M 05, M 27, M 02, M 24 e M 30 que apresentaram valores intermediários de Ca, P, Fe, Mg e Mn. No quadrante positivo de X e de Y localizaram-se as amostras M 20, M 21, M 15, M 16 e M 09 as quais se caracterizaram por teores mais baixos de Ca, P, Mg e Mn e teores intermediários de Fe. No quadrante negativo de X e positivo de Y se localizou a amostra M 22 que se caracteriza por altos teores de Fe.

quadrante positivo de X e negativo de Y (duas amostras). Sendo que as duas últimas amostras mostraram similaridades, nos teores dos metais, com as amostras produzidas no Estado do Rio Grande do Sul (RS). Essas características podem estar relacionadas a composição química do solo em que é feito o plantio da cana de açúcar, ao clima da região e/ou a variedade das espécies selecionadas no plantio bem como a maturação da cana de açúcar, considerando à proximidade geográfica entre esses Estados (YADAV et al., 2010; MACHADO, 2012; MINGUETI, 2012).

FIGURA 24 – GRÁFICO DE ESCORES DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES MÉDIOS DE Fe, Mn, Mg, Ca E P EM RELAÇÃO AOS FABRICANTES DAS AMOSTRAS DE MELADO DE CANA.



A correlação dos teores dos elementos analisados em relação ao fabricante (Figura 24) indicou que o fabricante I apresenta uma boa padronização no processo de fabricação do melado, já que as amostras, por ele produzidas, se localizaram no mesmo quadrante (positivo de X e de Y para duas amostras e negativo de X e de Y, para a outra). De forma similar, se observou o mesmo comportamento para o fabricante A em que as amostras, para este fabricante, se localizaram no quadrante positivo de X e negativo de Y.

Contudo, quando se compara a procedência das amostras em relação ao fabricante, é possível observar que as amostras produzidas pelo fabricante I tem origem no Estado do Rio Grande do Sul (RS) enquanto que as amostras manufaturadas pelo fabricante A são originárias do Estado do Paraná (PR). Isso indica que a região de

produção do melado pode influenciar no processamento de fabricação, podendo haver, assim, uma maior padronização no processamento em regiões que tradicionalmente produzem melado em relação a outras em que a produção ainda é incipiente; esse comportamento também foi observado nas amostras produzidas pelos fabricantes N, C, F e L, em que todas as amostras advém do Estado de Santa Catarina (SC) e se localizaram no mesmo quadrante (negativo de X e de Y). Ressalta-se, ainda, que a quantidade dos elementos estudados no melado também pode ser influenciada pelo grau de evaporação/concentração do caldo de cana durante o processo de produção deste derivado da cana de açúcar (NOGUEIRA et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- CATTELL, R.B. The screen test for the number of factors. **Multivariate Behavioral Research**, v. 1, p. 140-161, 1966.
- HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. de. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S - Engineering and Science**, v. 1, n.5, p. 83-90, 2015.
- JOLLIFFE, I.T. Discarding Variables in a Principal Component Analysis. II: Real Data. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 22, n. 1, p. 21–31, 1973.
- KAISER, H. F. The Varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, v. 23, n. 3.p. 187-200, 1958.
- MACHADO, S. S. **Tecnologia da fabricação do açúcar**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás: IFG-Inhumas, 2012. 56p.
- MINGUETI, F. F. **Influência dos sistemas de produção, convencional e orgânico, na qualidade da cana-de-açúcar (*saccharum spp*) e do açúcar mascavo**. Araras, 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e desenvolvimento rural) - Universidade Federal de São Carlos.
- NOGUEIRA, F. dos S.; FERREIRA, K. S.; CARNEIRO JUNIOR, J. de B.; PASSONI, L. C. Minerais em melados e em caldos de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, p.727-731, 2009.
- REIS, E. **Estatística multivariada aplicada**. Lisboa, 1997.
- SAVEGNAGO, R.P., CAETANO, S.L., RAMOS, S.B., NASCIMENTO, G.B., SCHMIDT, G.S., LEDUR, M.C. MUNARI, D.P. Estimates of genetic parameters, and cluster and principal components analyses of breeding values related to egg production traits in a White Leghorn population, **Poultry Science**, 90, p.2174-2188. 2011.
- YADAV, D.V.; JAIN, R.; RAI, R.K. Impact of Heavy Metals on sugarcane. In: SHERAMETI, I.; VARMA, A. **Soil heavy metals**. 2010. Cap. 16, p. 340-367.

CAPÍTULO 10. CONCLUSÕES

10.1 CONCLUSÕES

A otimização do método de extração assistida por ultrassom a partir de um planejamento de misturas do tipo Simplex Centróide demonstrou ser eficaz para determinar as melhores condições de extração de Fe, Mn, Ca, Mg e P em amostras de melado de cana, pelas técnicas espectrométricas de absorção atômica com chama e molecular no UV-VIS, por meio dos modelos estatísticos gerados, em que foram obtidas taxas de extração > 90,0 %.

As melhores taxas de extração para Fe e Mn foram obtidas com a utilização de 5,0 mL de água ultrapura como solvente extrator, enquanto para o Ca e o Mg foram necessários 3,77 mL de HNO₃ e 1,22 mL de H₂O. Para o P foi preciso utilizar, como solvente extrator, uma mistura ternária de 1,67 mL de HNO₃, 2,00 mL de HCl e 1,30 mL de H₂O, devido ao mesmo demonstrar estar ligado a matriz de melado de cana de uma forma mais complexa que os demais elementos analisados. Para a determinação de todos os elementos foi utilizada uma massa de 0,5 gramas de melado de cana, 10 minutos de extração em banho de ultrassom em temperatura ambiente, com potência de 100 W e frequência de sonicação de 37 kHz.

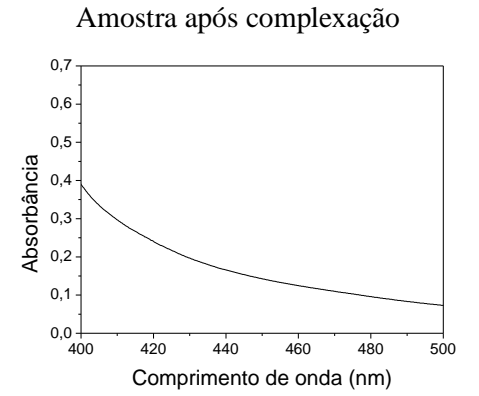
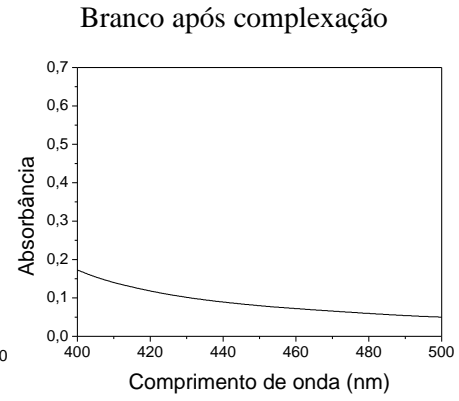
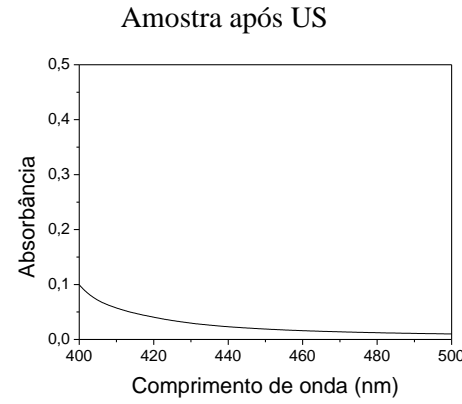
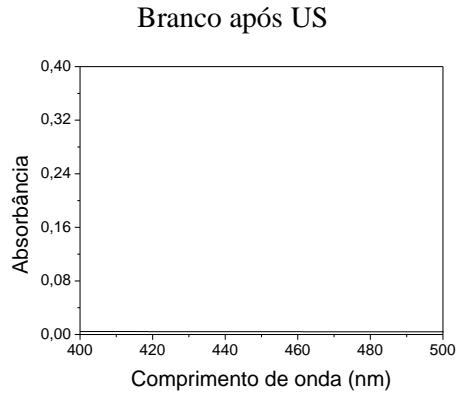
O estudo de validação demonstrou a eficiência dos métodos de extração assistida por ultrassom, pois os parâmetros avaliados (linearidade, LD e LQ, precisão e exatidão) ficaram dentro dos valores recomendados por guias orientativos e trabalhos relacionados na literatura. Assim, de acordo com os resultados do estudo de otimização e de validação dos métodos de extração assistida por ultrassom para a determinação de Fe, Mn, Ca, Mg e P em amostras de melado de cana foi possível verificar que as metodologias desenvolvidas são capazes de produzir resultados exatos e precisos, fazendo com que a sua aplicação em laboratórios de análises rotineiras seja possível, além de permitir o monitoramento dos níveis desses micro e macronutrientes nesse alimento e a garantia da qualidade do produto. Além disso, a extração assistida por ultrassom também se apresenta como uma alternativa vantajosa e interessante no tratamento de amostras com altos teores de açúcares, uma vez que utiliza um baixo volume de reagentes, minimizando assim a geração de resíduos, o impacto ao meio ambiente, os riscos de contaminação e oferecendo maior segurança ao analista, além de ser mais rápida quando comparada a outros métodos convencionais de preparo de amostra.

Em relação a aplicação da análise de componentes principais (ACP), foi verificado que os teores de Fe, Mn, Mg, Ca e P, nas amostras de melado de cana, podem variar de acordo com alguns fatores tais como a variedade de cana, o grau de maturação da matéria-prima, o clima da região, as características físico-químicas do solo, podendo haver, também, interferentes no processamento de fabricação do melado, como na concentração do caldo ou, até mesmo, por meio de contaminantes no equipamento de produção. Também pôde ser constatado através da ACP, que alguns fabricantes conseguem manter uma padronização do produto final e que esta pode estar relacionada com a região em que se é fabricado o melado.

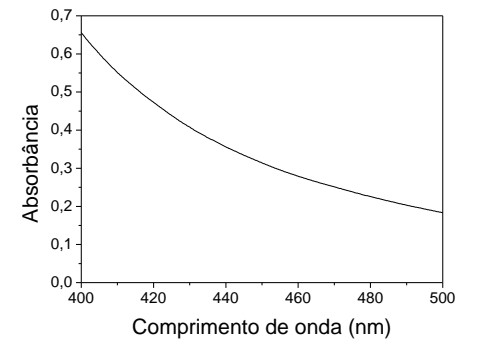
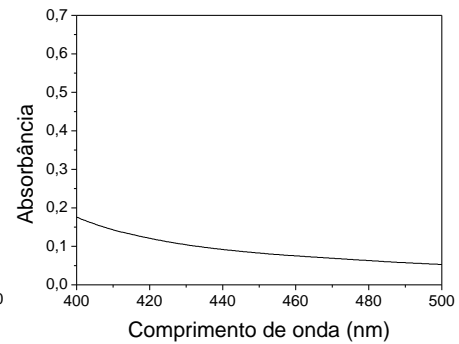
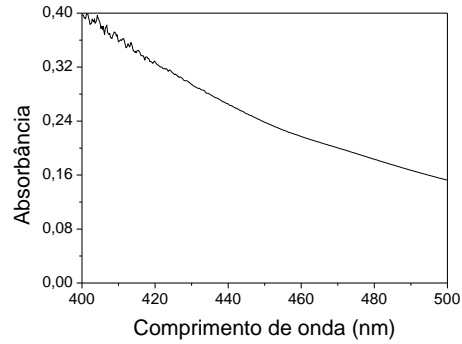
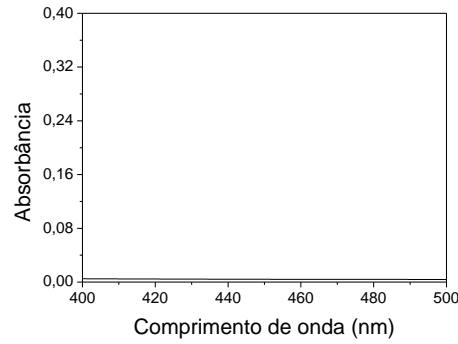
**APÊNDICE. ESPECTROS DE UV-VIS OBTIDOS PARA O P REFERENTE ÀS
CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS**

Exp

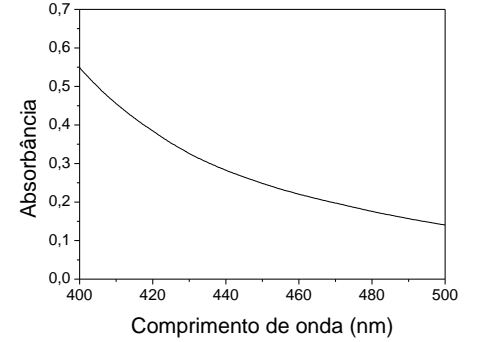
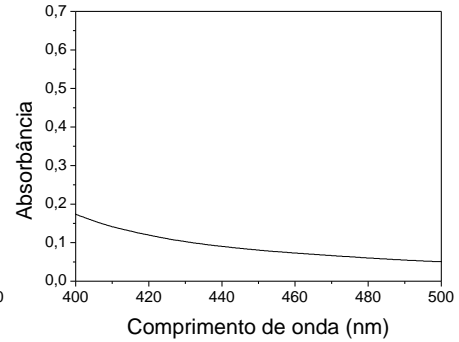
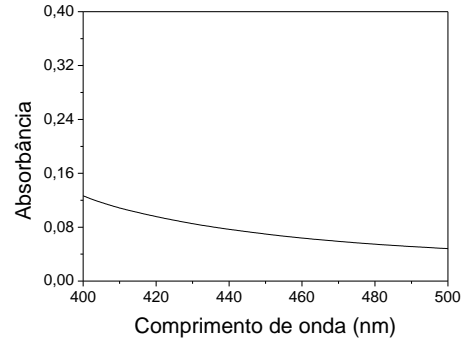
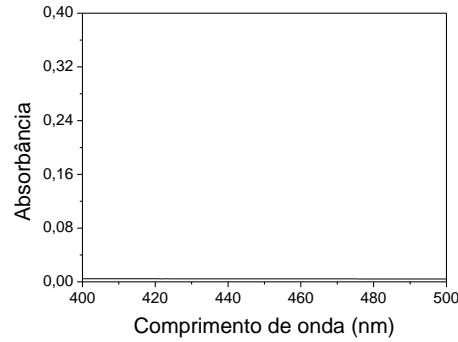
1



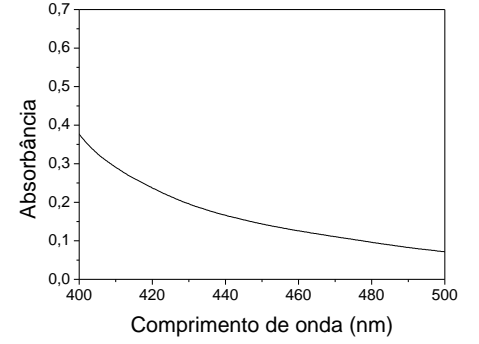
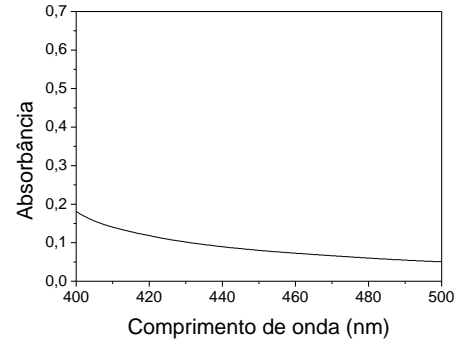
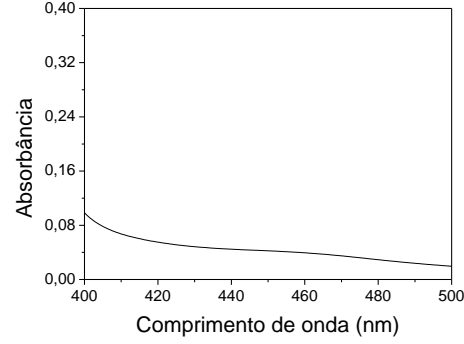
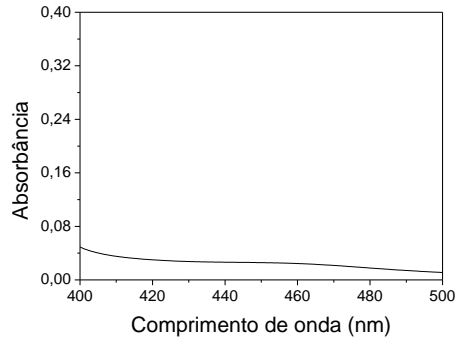
2



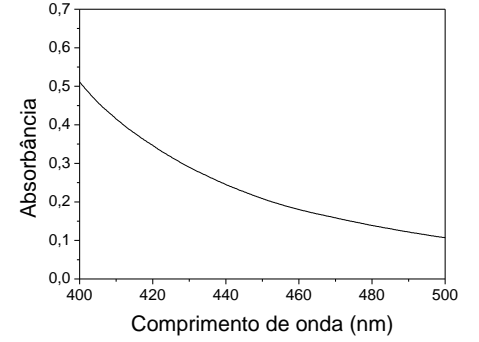
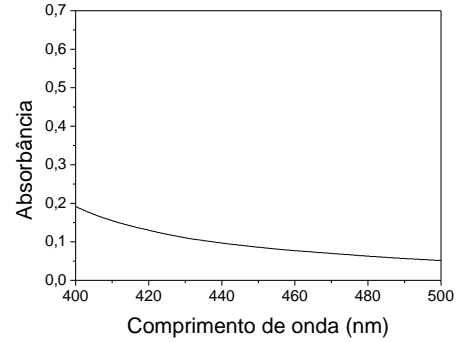
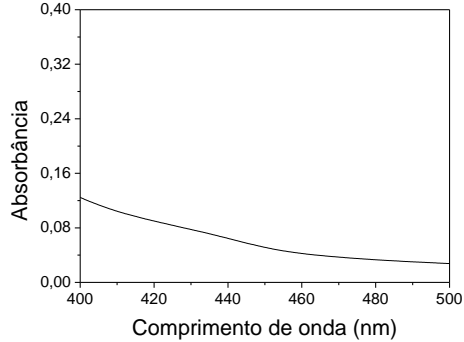
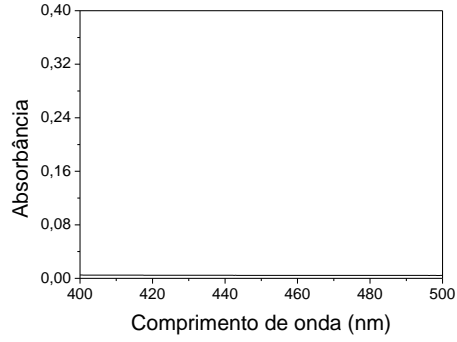
3



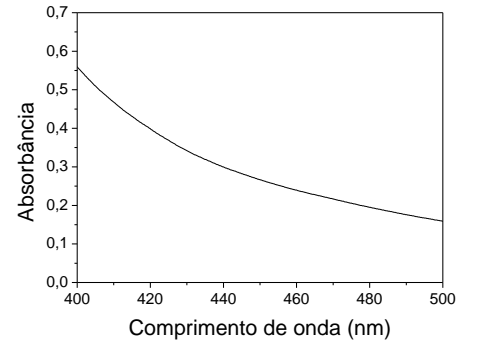
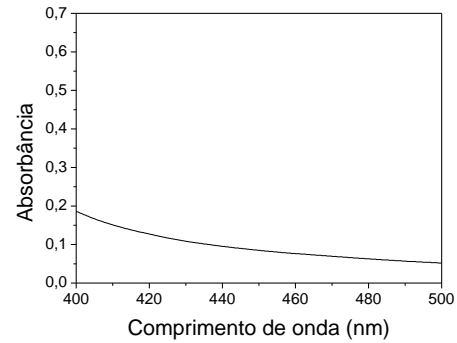
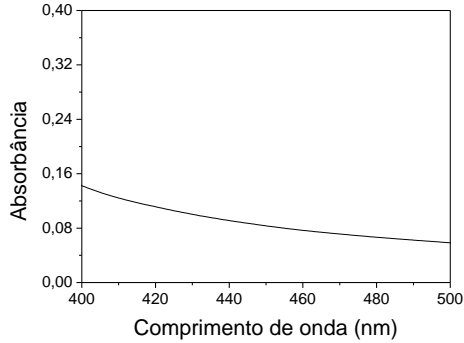
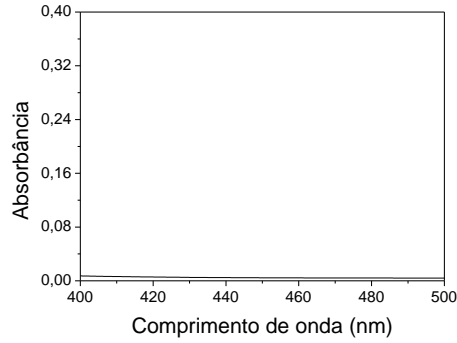
4



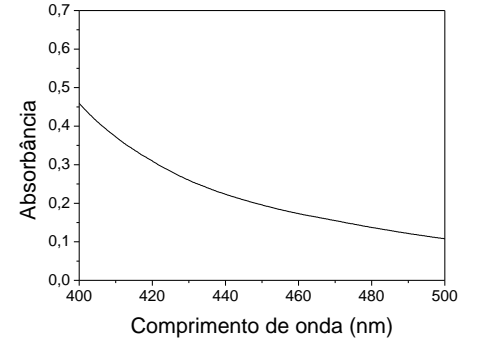
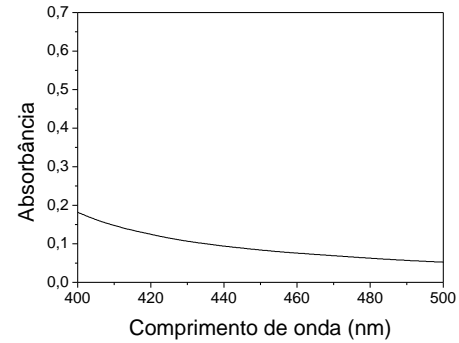
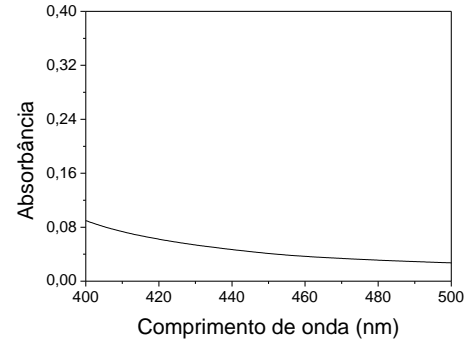
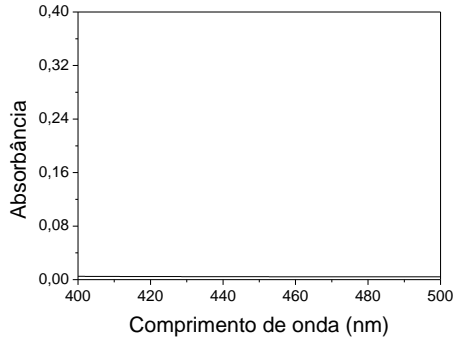
5



6



7



MO

