

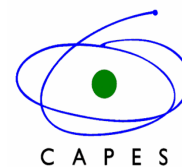


UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

Programa de Pós-Graduação em Química

CPPQ/UNICENTRO

MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA



MARIELI APARECIDA FERREIRA

**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)**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner

GUARAPUAVA-PR

2016

MARIELI APARECIDA FERREIRA

**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)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner

GUARAPUAVA-PR

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por sempre me mostrar o melhor caminho a ser seguido.

A minha mãe Marilda pela força, dedicação, motivação e por ter acreditado que um dia chegaria até aqui.

Ao meu filho Henri Gabriel, que em muitos momentos, foi o meu único motivo de alegria, não me deixando desistir dos meus objetivos.

Ao meu namorado Alison pelo carinho, força, motivação e pelos momentos bons ao seu lado.

À professora Dra. Maria Lurdes Felsner pela orientação, dedicação, paciência, responsabilidade e disponibilidade para a elaboração desta dissertação.

Uma dedicação especial a minha amiga Suelen Andolfatto pela amizade conquistada durante este período, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório LabGati Camila Kulek de Andrade, Chalder Nogueira Nunes, Ericka Diaz, Fernanda Galvão, Jeferson Meira dos Santos, Jucimara Kulek de Andrade, Luciane Miranda, Mariane Butik, Suelen Andolfatto, Vanessa Moraes e Verônica Olmos pela ajuda e momentos de descontração no laboratório.

À CAPES pela bolsa concedida.

À UNICENTRO.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO.

Enfim, a todos que de alguma forma me apoiaram e me ajudaram para que eu chegasse até aqui.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

(Bill Gates)

RESUMO

O açúcar mascavo é resultado da evaporação e concentração do caldo da cana de açúcar recém-extraído até o ponto de cristalização da sacarose. Este se caracteriza pela alta concentração de açúcares, conteúdo de minerais e traços de vitaminas, conferindo-lhe um grande valor nutricional e medicinal. Apesar disso, ainda são escassas as pesquisas voltadas a identificação e quantificação de minerais essenciais nesse alimento. Essa escassez pode estar relacionada às dificuldades encontradas no tratamento da amostra, que exige um pré-tratamento que consiste na destruição da maior parte de sua matéria orgânica, que geralmente é feito por métodos convencionais de preparo de amostra, como a digestão por via seca ou a digestão por via úmida. Assim, o objetivo desse trabalho foi otimizar e validar metodologias analíticas alternativas de preparo de amostra para a determinação de Zn, Mn, Mg e Fe em açúcar mascavo por FAAS, utilizando as reações Fenton e de Foto-Oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom. Para a otimização da reação Fenton como preparo de amostra para a determinação de Mn foi aplicado um planejamento fatorial 2^2 , em que foram avaliadas as concentrações de H_2O_2 e de Fe. Para a otimização da reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg foi aplicado um planejamento fatorial 2^4 , em que foram avaliados a concentração de H_2O_2 , o pH da solução, a concentração da solução tampão e o tempo de irradiação UV, utilizando-se como resposta a absorbância a 400 nm das soluções de açúcar mascavo. E para a digestão ácida assistida por ultrassom como preparo de amostra para a determinação de Fe foi aplicada uma otimização univariada em que foram avaliados a massa da amostra e o volume de água régia. Para confirmar a confiabilidade dos métodos desenvolvidos foi realizada a validação dos mesmos, em que foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão, a partir da aplicação de diferentes testes estatísticos. As curvas analíticas empregadas foram de padrão externo para todos os metais analisados. Os limites de quantificação (LQ) para todos os metais ficaram abaixo do primeiro ponto da curva analítica. A precisão dos métodos de preparo de amostra propostos foi avaliada pela aplicação de um teste- F de comparação das variâncias ponderadas dos resultados obtidos pela aplicação dos métodos alternativos propostos com as variâncias ponderadas dos resultados obtidos pelos métodos adotados como referência (digestão por via seca e digestão por via úmida). A reação Fenton foi comparada com os dois métodos adotados como referência e a reação de Foto-Oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom foram comparadas somente com a digestão por via seca. A precisão da reação Fenton também foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD%) obtido em condições de repetitividade. Os valores de $F_{calculado}$ para a análise de Mn a partir da reação Fenton, de Mg a partir da reação de Foto-oxidação UV e de Fe a partir da digestão ácida assistida por ultrassom foram inferiores ao $F_{crítico}$ com $p > 0,05$ comprovando-se que não existem diferenças significativas de precisão entre os métodos comparados. O valor de $F_{calculado}$ para o Zn a partir da reação de Foto-Oxidação UV foi superior ao $F_{crítico}$ com $p < 0,05$ sugerindo que existem diferenças significativas de precisão. Para verificar se a Foto-Oxidação UV seria um método mais preciso do que a digestão por via seca foi aplicado novamente o teste- F de comparação das variâncias ponderadas monocaudal. Os resultados demonstraram que a Foto-oxidação UV tem menores desvios padrão ponderados do que a digestão por via seca, indicando que esta apresenta melhor precisão para a determinação de Zn em amostras de açúcar mascavo do que o método adotado como referência. O valor de RSD (%) para a análise de Mn a partir da reação Fenton foi inferior ao recomendado pela AOAC (RSD (%) < 7,3). A exatidão dos métodos de preparo de amostra alternativos propostos foi avaliada pela comparação com os métodos de referência (digestão por via seca e digestão por via úmida), aplicando-se um teste- t pareado e a análise de regressão linear. Novamente, a reação Fenton foi comparada com os dois métodos adotados como referência e a reação de Foto-oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom foram comparadas apenas com a digestão por via seca. A exatidão da reação Fenton também foi avaliada por ensaios de recuperação por adição de padrão. Os resultados obtidos para o teste- t pareado demonstraram que não existem diferenças significativas entre os métodos comparados, pois $t_{calculado} < t_{crítico}$ com $p > 0,05$. Além disso, os elevados valores de $F_{regressão}$ obtidos na análise de regressão linear confirmaram que os modelos lineares para Mn, Zn, Mg e Fe são adequados e os teores destes metais apresentam uma correlação linear entre os métodos de preparo de amostra avaliados. As taxas de recuperação da análise de Mn a partir da reação Fenton (90,7 - 97,5%) ficaram dentro dos limites recomendados pela AOAC (80-110%). Tais resultados indicam que as metodologias de preparo de amostra propostas apresentam exatidão adequada. Assim, sugere-se que as metodologias desenvolvidas podem ser aplicadas no controle de qualidade do açúcar mascavo com vantagens em relação aos métodos convencionais de preparo de amostra como simplicidade, rapidez, baixo custo e redução de resíduos tóxicos além de oferecerem maior segurança ao analista.

Palavras-Chaves: *Reação Fenton, reação de Foto-Oxidação UV, digestão ácida assistida por ultrassom, açúcar mascavo, metais, espectrometria de absorção atômica em chama, validação de métodos.*

ABSTRACT

The brown sugar is a result of evaporation and concentration of the juice of freshly extracted sugar cane to the crystallization point of sucrose. This is characterized by high concentration of sugars, mineral content and trace amounts of vitamins, giving it a high nutritional and medicinal value. Nevertheless, there is still little research focused on identification and quantification of essential minerals that food. This scarcity can be related to difficulties in the treatment of the sample, which requires a pre-treatment involving the destruction of most of the organic matter, which is usually done by standard sample preparation methods such as digestion by dry or digestion by wet. The objective of this work was to optimize and validate sample preparation alternative analytical methodologies for the determination of Zn, Mn, Mg and Fe in brown sugar by FAAS using the Fenton reaction and UV photo-oxidation and acid digestion assisted by ultrasound. To optimize the Fenton reaction as sample preparation for determination of Mn was used a factorial design 2^2 , that were evaluated concentrations H_2O_2 and Fe. For the optimization of UV photo-oxidation reaction for the determination of Zn and Mg was applied to a factorial design 2^4 , which evaluated the concentration of H_2O_2 , the solution pH, the concentration of the buffer solution and the UV irradiation time, using as the absorbance response at 400 nm of brown sugar solutions. And for acid digestion assisted by ultrasound as sample preparation for the determination of Fe a univariate optimization which evaluated the weight of the sample and the volume of aqua regia was applied. To confirm the reliability of the developed methods was performed to validate the same, which evaluated the linearity parameters, limits of detection (LD) and quantification (LQ), precision and accuracy, from the application of different statistical tests. The used analytical curves were external standard for all metals analyzed, as they showed good linearity in the concentration range investigated, with values of $F_{regression} \gg F_{critical}$ and no lack of linear model fit. The limits of quantification (LQ) for all metals are below the first point of the calibration curve. The accuracy of the sample preparation methods proposed was evaluated by applying a comparison of test- F of the variances weighted the results obtained by the application of alternative methods proposed with the variances weighted the results of the methods adopted as reference (digestion dry and humid digestion). The Fenton reaction has been compared with the two methods adopted as reference, and the reaction UV photo-oxidation and acid digestion assisted by ultrasound were compared only with the digestion dry. The accuracy of the Fenton reaction was also assessed by the standard deviation (% RSD) obtained under repeatable conditions. The $F_{calculated}$ values for Mn analysis from the Fenton reaction of Mg from the UV photo-oxidation reaction and Fe from the acid digestion were assisted by ultrasound below the $F_{critical}$ $p > 0.05$ confirming no significant differences in accuracy between the comparative methods. The value for Zn $F_{calculated}$ from the UV photo-oxidation reaction was superior to $F_{critical}$ $p < 0.05$ suggesting that there are significant differences in accuracy. To verify that the photo-oxidation UV would be a more accurate method than the digestion dry was applied again the comparison of test- F of the variances weighted tail. The results showed that the UV photo-oxidation is lower than the standard weighted digestion dry deviations, indicating that it presents better accuracy for determination of Zn brown sugar samples adopted as the reference method. The value of RSD (%) for Mn analysis from the Fenton reaction was lower than recommended by the AOAC (RSD (%) < 7.3). The accuracy of the alternative sample preparation methods proposed was evaluated by comparison with the reference methods (digestion dry and humid digestion), applying a paired test- t and linear regression analysis. Again, the Fenton reaction was compared with the two methods adopted as a reference and UV photo-oxidation reaction and the acid digestion assisted by ultrasound were compared by digestion with only dry. The accuracy of the Fenton reaction was also assessed by standard addition by recovery experiments. The results for the paired test- t showed no significant differences between the methods compared, because $t_{calculated} < t_{critical}$ with $p > 0.05$. Moreover, the high $F_{regression}$ values obtained in the linear regression analysis confirmed that linear models for Mn, Zn, Mg and Fe are suitable, and the content of these metals exhibit a linear correlation between the sample preparation methods evaluated. The Mn analysis of recovery rates from the Fenton reaction (90.7 to 97.5%) were within the limits recommended by the AOAC (80-110%). These results indicate that the sample preparation methodologies proposals presented adequate accuracy. Thus, it is suggested that the methodologies developed can be applied in the quality control of brown sugar with advantages over conventional sample preparation methods such as simplicity, speed, low cost and reduction of toxic waste in addition to offering greater security to the analyst.

Key Words: Fenton reaction, photo-oxidation UV reaction, acid digestion assisted by ultrasound, brown sugar, metals, atomic absorption spectrometry in flame, validation methods.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1. Introdução	2
1.2. Objetivos	5
1.2.1. Objetivo Geral	5
1.2.2. Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1. Cana-de-Açúcar	7
2.2. Açúcar Mascavo	8
2.3. Minerais Essenciais	12
2.4. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)	16
2.4.1. Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS)	18
2.5. Métodos de Preparo de Amostra	19
2.5.1. Métodos de Preparo de Amostra Adotados como Referência	20
2.5.1.1. Digestão por Via Seca	20
2.5.1.2. Digestão por Via Úmida	21
2.5.2. Métodos Analíticos Alternativos de Preparo de Amostra	21
2.5.2.1. Processo Oxidativos Avançados (POAs)	21
2.5.2.1.1. Reação Fenton	23
2.5.2.1.2. Reação de Foto-Oxidação UV	27
2.5.2.2. Digestão Ácida Assistida por Ultrassom	30
2.6. Validação dos Métodos Alternativos de Preparo de Amostra	33
2.6.1. Seletividade	34
2.6.2. Curva Analítica e Linearidade	34
2.6.3. Intervalo de Trabalho	37
2.6.4. Limite de Detecção (LD)	37
2.6.5. Limite de Quantificação (LQ)	37
2.6.6. Precisão	38
2.6.7. Exatidão	39
2.6.8. Robustez	40
CAPÍTULO 3. METODOLOGIA	41

3.1. Amostragem	42
3.2. Reagentes e Equipamentos	43
3.3. Técnicas Limpas	44
3.4. Espectrofotometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS)	45
3.5. Preparo das Soluções de Açúcar Mascavo	46
3.5.1. Digestão por Via Seca	46
3.5.2. Digestão por Via Úmida.....	47
3.5.3. Reação Fenton	48
3.5.4. Reação de Foto-Oxidação UV.....	49
3.5.5. Digestão Ácida Assistida por Ultrassom.....	51
3.6. Otimização dos Métodos Analíticos Alternativos de Preparo de Amostra	53
3.6.1. Otimização da Reação Fenton por Planejamento Fatorial	53
3.6.2. Otimização da Reação de Foto-Oxidação UV por Planejamento Fatorial	54
3.6.3. Otimização Univariada da Digestão Ácida Assistida por Ultrassom	55
3.7. Validação dos Métodos de Preparo de Amostra Alternativos	56
3.7.1. Curvas Analíticas e Linearidade.....	56
3.7.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	57
3.7.3. Precisão	57
3.7.4. Exatidão.....	58

CAPÍTULO 4. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS DE PREPARO DE AMOSTRA

4.1. Aplicação da Reação Fenton para a Determinação de Mn por FAAS	60
4.1.1. Otimização da Reação Fenton.....	60
4.1.2. Estudo de Validação da Reação Fenton	65
4.1.2.1. Curvas Analíticas e Linearidade.....	65
4.1.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	67
4.1.2.3. Precisão e Exatidão	68
4.1.2.3.1. Precisão	68
4.1.2.3.2. Exatidão.....	69
4.2. Aplicação da Reação de Foto-Oxidação UV para a Determinação de Zn e Mg em Açúcar Mascavo por FAAS	73
4.2.1. Estudo de Otimização da Reação de Foto-Oxidação UV.....	73
4.2.2. Estudo de Validação da Reação de Foto-Oxidação UV Aplicada a Análise de Zn e Mg em Açúcar Mascavo	80
4.2.2.1. Curvas Analíticas e Linearidade.....	80
4.2.2.2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	83
4.2.2.3. Precisão e Exatidão	84
4.2.2.3.1. Precisão	85
4.2.2.3.2. Exatidão.....	86
4.3. Digestão Ácida Assistida por Ultrassom como um Método de Preparo de Amostra para a Determinação de Fe por FAAS	89
4.3.1. Estudo de Otimização da Digestão Ácida Assistida por Ultrassom.....	89

4.3.2. Resultados da Validação da Digestão Ácida Assistida por Ultrassom.....	93
4.3.2.1. Curvas Analíticas e Linearidade.....	93
4.3.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	95
4.3.2.3. Precisão e Exatidão	96
4.3.2.3.1. Precisão	96
4.3.2.3.2. Exatidão.....	97
CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Comparação do valor nutritivo (em 100 gramas) dos açúcares refinado e mascavo	12
Tabela 2.2. Principais Processos Oxidativos Avançados (POAs).	23
Tabela 3.1. Informações relevantes das amostras de açúcar mascavo	43
Tabela 3.2. Parâmetros operacionais empregados na determinação de Mn, Zn, Mg e Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS	46
Tabela 3.3. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 aplicado a reação Fenton	53
Tabela 3.4. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^4 aplicado a reação de Foto-Oxidação UV.	55
Tabela 3.5. Condições utilizadas para a otimização univariada da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS	55
Tabela 4.1. Matriz do planejamento fatorial 2^2 para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS.....	61
Tabela 4.2. Efeitos médios calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial 2^2 para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS.....	61
Tabela 4.3. Parâmetros de calibração e dados do estudo de linearidade.	65
Tabela 4.4. Validação dos dados em testes de sensibilidade para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS usando a reação Fenton.....	67
Tabela 4.5. Teores médios de Mn e seus respectivos desvios-padrão obtidos para as amostras de açúcar mascavo aplicando-se a reação Fenton, a digestão por via seca e a digestão por via úmida como métodos de preparo de amostra	68
Tabela 4.6. Resultados do estudo de precisão (teste- <i>F</i>) da reação Fenton para a determinação de Mn por FAAS	69
Tabela 4.7. Estudo de exatidão da reação Fenton para a determinação de Mn em amostras de açúcar mascavo por FAAS	70
Tabela 4.8. Dados dos ensaios de recuperação da reação Fenton para a determinação de Mn em amostras de açúcar mascavo por FAAS	70

Tabela 4.9. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da reação Fenton como método de preparo de amostra	71
Tabela 4.10. Matriz do planejamento fatorial 2^4 para a otimização da reação de Foto-Oxidação UV como método alternativo de preparo de amostra para análise de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS	73
Tabela 4.11. Resultados do estudo do tempo de irradiação UV para a determinação de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS fazendo uso da reação de Foto-Oxidação UV. Os valores são expressos como médias e desvios-padrão em mg/100g	79
Tabela 4.12. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Zn e Mg por FAAS no nível de 95% de confiança	80
Tabela 4.13. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.....	82
Tabela 4.14. Validação dos dados em testes de sensibilidade para a determinação de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS usando a reação de Foto-Oxidação UV	83
Tabela 4.15. Teores médios de Zn obtidos em amostras de açúcar mascavo pela aplicação da reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca com seus respectivos desvios-padrão	84
Tabela 4.16. Teores médios de Mg obtidos em amostras de açúcar mascavo pela aplicação da reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca com seus respectivos desvios-padrão	85
Tabela 4.17. Resultados do estudo de precisão (teste- <i>F</i>) da reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg por FAAS.....	85
Tabela 4.18. Estudo de exatidão da reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg em amostras de açúcar mascavo por FAAS.....	86
Tabela 4.19. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da reação de Foto-Oxidação UV como método de preparo de amostra alternativo para a determinação de Zn por FAAS.	87
Tabela 4.20. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da reação de Foto-Oxidação UV como método de preparo de amostra alternativo para a determinação de Mg por FAAS	87
Tabela 4.21. Resultados do estudo de otimização univariado da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS. Os dados são apresentados como médias e desvios-padrão	89
Tabela 4.22. Curvas de Padrão Externo (PE) e de Simulação de Matriz (SM) para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS no nível de 95% de confiança.....	93

Tabela 4.23. Dados da análise de regressão linear para a determinação de Fe por FAAS no nível de 95% de confiança.....	94
Tabela 4.24. Validação dos dados em testes de sensibilidade para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS.	95
Tabela 4.25. Teores médios de Fe obtidos em amostras de açúcar mascavo a partir da digestão ácida assistida por ultrassom e da digestão por via seca com seus respectivos desvios-padrão.....	96
Tabela 4.26. Dados do estudo de precisão (teste- <i>F</i> e intervalos de confiança) da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.....	97
Tabela 4.27. Dados do teste- <i>t</i> pareado da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.....	97
Tabela 4.28. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da digestão ácida assistida por ultrassom como método de preparo de amostra para a determinação de Fe por FAAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Algumas amostras de açúcar mascavo comercializadas na cidade de Guarapuava-PR	9
Figura 2.2. Fluxograma do processo de preparação da cana-de-açúcar e a obtenção do açúcar mascavo	11
Figura 2.3. Esquema de um espectrômetro de absorção atômica.....	17
Figura 2.4. Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama	18
Figura 2.5. Representação dos ciclos de rarefação e compressão das bolhas com a passagem da onda acústica.....	31
Figura 2.6. (1) Fenômeno de cavitação de gás sobre a superfície do sólido; (2) Divisão do sólido após a implosão das bolhas; (3) Novas partículas formadas com tamanho reduzido	32
Figura 3.1. Amostras de açúcar mascavo de diferentes fabricantes e lotes.....	42
Figura 3.2. Digestor UV utilizado para o preparo das soluções de açúcar mascavo usando a reação de Foto-Oxidação UV	44
Figura 3.3. Espectrofotômetro de absorção atômica em chama.....	45
Figura 3.4. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo pela digestão por via seca.....	46
Figura 3.5. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo pela digestão por via úmida.....	47
Figura 3.6. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo pela reação Fenton utilizada na análise de Mn por FAAS	48
Figura 3.7. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo usando a reação de Foto-Oxidação UV para a análise de Zn e Mg	49
Figura 3.8. Placas de Petri com as soluções de açúcar mascavo no digestor UV	50
Figura 3.9. A) Solução de açúcar mascavo (amostra 09G) e B) solução de açúcar mascavo (amostra 05D) antes e depois da irradiação UV	51
Figura 3.10. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo utilizadas na análise de Fe pelo processo de digestão ácida assistida por ultrassom.....	52

Figura 3.11. Soluções de açúcar mascavo dispostas no banho ultrassom durante a digestão ácida assistida por ultrassom	53
Figura 4.1. (A) Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados do planejamento fatorial no nível de confiança de 95% e (B) Gráfico do efeito de interação entre a concentração de H ₂ O ₂ e de Fe para o planejamento fatorial 2 ²	62
Figura 4.2. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Mn por FAAS	66
Figura 4.3. Comparação por regressão linear dos métodos de preparo de amostra (A) reação Fenton e digestão por via seca e (B) reação Fenton e digestão por via úmida aplicados à determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS	72
Figura 4.4. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do planejamento fatorial 2 ⁴	74
Figura 4.5. Diagrama para interpretação dos efeitos do planejamento fatorial 2 ⁴ para a otimização da reação de Foto-Oxidação UV	75
Figura 4.6. Gráfico de interação entre o pH e a concentração da solução tampão.....	77
Figura 4.7. Gráfico de interação entre o pH e o tempo de irradiação UV	77
Figura 4.8. Espectros de absorção molecular obtidos para as amostras de açúcar mascavo: (A) 05D e (B) 10H. Linha preta: amostra antes do tratamento de Foto-Oxidação UV. Linha vermelha: amostra após o tratamento de Foto-Oxidação UV	78
Figura 4.9. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Zn por FAAS utilizando a reação de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra	81
Figura 4.10. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Mg por FAAS utilizando a reação de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra	81
Figura 4.11. Comparação por regressão linear da reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca aplicadas como preparo de amostra à determinação de Zn em açúcar mascavo por FAAS.....	88
Figura 4.12. Comparação por regressão linear da Reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca aplicadas como preparo de amostra à determinação de Mg em amostras de açúcar mascavo por FAAS.....	88
Figura 4.13. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Fe por FAAS	94

Figura 4.14. Comparação por regressão linear dos métodos de preparo de amostra (digestão ácida assistida por ultrassom e digestão por via seca) aplicados à determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAS - Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica).
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists.
- CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.
- CV - Coeficiente de Variação.
- EDL - Lâmpadas de Descarga sem Eletrodos.
- EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural.
- FAAS - Flame Atomic Absorption Spectrometer (Espectrometria de Absorção Atômica em Chama).
- HCL - Hollow-Cathode Lamp (Lâmpada de Catodo Oco).
- IAL - Instituto Adolfo Lutz.
- ICH - International Conference on Harmonisation.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial.
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry.
- LabGati - Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação.
- LD - Limite de Detecção.
- LQ - Limite de Quantificação.
- POAs - Processos Oxidativos Avançados.
- r - Coeficiente de Correlação.
- R^2 - Coeficiente de Determinação.
- Rec. - Recuperação.
- RSD - Relative Standard Deviation (Desvio padrão relativo).
- UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar.
- UV - Ultravioleta.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

Nos últimos anos, a mudança de hábitos alimentares da população mundial, que vem adotando dietas ricas em açúcares, gorduras e proteínas e pobres em carboidratos, minerais e vitaminas, tem refletido no aumento de doenças como a arteriosclerose, hipertensão e diabetes e na preocupação dos órgãos governamentais com relação ao aumento das carências nutricionais (ALMEIDA *et al.*, 2009; SPADA *et al.*, 2010; LETERME *et al.*, 2006; RIMM, 2002). Desta forma, visando a busca por alimentos minimamente processados, tais como o açúcar mascavo, vem aumentando significativamente a fim de melhorar a qualidade de vida. Isto tem refletido no aumento mundial do consumo de açúcar mascavo como adoçante em substituição ao açúcar refinado e na sua inclusão na formulação de alimentos e bebidas, especialmente em produtos integrais (COSTA e JUNGEN, 2006).

O açúcar mascavo é resultado da evaporação e concentração do caldo da cana de açúcar recém-extraído até o ponto de cristalização da sacarose (ARAÚJO *et al.*, 2011; VERRUMA-BERNARDI *et al.*, 2010). Este se caracteriza pela alta concentração de açúcares (glicose, sacarose e frutose), conteúdo de minerais e traços de vitaminas, conferindo-lhe um grande valor nutricional e medicinal (ARAÚJO *et al.*, 2011; QUINÁIA e NÓBREGA, 2000). Ao seu consumo têm sido atribuídos efeitos benéficos à saúde tais como efeitos citoprotetores, efeitos anticariogênicos, fortalecimento do sistema imunológico e redução da incidência de diabetes e hipertensão (JAFFÉ, 2012; JAFFÉ, 2015).

Recentemente, tem sido observado um grande interesse por parte dos pesquisadores na identificação e quantificação de minerais e fitoquímicos em alimentos, tanto em nações desenvolvidas como em desenvolvimento, por acreditar-se que muitos problemas de saúde estejam relacionados, pelo menos em parte, à insuficiência de determinados minerais (SMOLIN e GROSVENOR, 2007). A importância da inclusão de minerais essenciais na dieta tem sido amplamente discutida em textos sobre nutrição (GONÇALVES, TEODORO e TAKASE, 2007).

A concentração de micro e macro minerais em um alimento representa a diferença entre a sua essencialidade e sua toxicidade. Sendo assim, torna-se imprescindível monitorar os teores destes minerais em açúcar mascavo para assegurar a sua presença na dieta em níveis

adequados para uma boa nutrição. Os minerais, quando presentes na dosagem correta, são responsáveis por diversas funções no organismo, como por exemplo, o Zn é mineral constituinte da insulina e de muitas enzimas vitais sendo importante, também, para a síntese de proteínas, a formação de colágeno, para o sistema imunológico, para a cicatrização de feridas e na ação da insulina (GUPTA e GUPTA, 2014). O Mn é necessário, principalmente, para a produção de proteínas e o metabolismo das gorduras e, importante também, para o desenvolvimento do cérebro e dos ossos, para o sistema imunológico e regulação do açúcar no sangue (GUPTA e GUPTA, 2014). O Mg tem como principais funções catalisar enzimas envolvidas na produção de energia, ajudando a evitar tonturas, depressão e fraqueza muscular e, auxilia também, na captação de Ca e K e no desenvolvimento de doenças crônicas (GUPTA e GUPTA, 2014). E o Fe é um mineral essencial para a produção de hemoglobina no sangue e mioglobina nos músculos, responsável também, pela oxigenação das células do sangue, além de ser essencial para muitas enzimas que são importantes para o crescimento (GUPTA e GUPTA, 2014).

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar e seus derivados (açúcar refinado, açúcar mascavo, melado, rapadura, álcool e bagaço de cana) apresentando uma grande importância econômica para o país (ASSIS *et al.*, 2014). Apesar disso, ainda são escassas as pesquisas voltadas a identificação e quantificação de minerais essenciais em produtos como açúcar mascavo, melado e rapadura por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) (NOGUEIRA *et al.*, 2009; WILWERTH *et al.*, 2009; NATALINO, 2006). Essa escassez pode estar relacionada às dificuldades encontradas no tratamento da amostra necessário para a análise de alimentos açucarados por esta técnica analítica. Sendo o açúcar mascavo um alimento sólido constituído de altos teores de compostos orgânicos como açúcares, proteínas e ácidos, o qual exige um pré-tratamento prévio da amostra que consiste na destruição da maior parte de sua matéria orgânica. Esta etapa de pré-tratamento pode ser considerada como a etapa principal e a mais complexa da análise, pois consome maior tempo, sendo também considerada, a etapa que se podem cometer mais erros e de maior custo (OLIVEIRA, 2003; ARRUDA e SANTELLI, 1997; DUTRA, SANTOS e COELHO, 2004). E esta etapa de pré-tratamento da amostra geralmente é feita por métodos de digestão por via úmida ou por via seca (GROMBONI *et al.*, 2010; CARRILHO *et al.*, 2002).

A análise direta deste tipo de matriz por FAAS poderia afetar o desempenho do nebulizador, devido a sua alta viscosidade, causar flutuações na chama e acumulação de

depósitos sólidos na cabeça do queimador, devido ao alto conteúdo de sólidos solúveis (BRANDÃO *et al.*, 2012). Todavia, embora necessários, os métodos clássicos de preparo de amostra apresentam algumas desvantagens como o uso de grandes volumes de reagentes, a manipulação da amostra por um longo período de tempo, a utilização de elevadas temperaturas, podendo ocorrer ainda, contaminação ou perda do analito de interesse por volatilização (SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010; POHL, 2009; OLIVEIRA, 2003; MAGALHÃES e ARRUDA, 1998).

Com o intuito de minimizar estes inconvenientes e tornar mais rápida e precisa a análise de minerais por FAAS, novas propostas analíticas vêm surgindo para o tratamento da amostra visando a sua mineralização. Uma dessas propostas são os processos oxidativos avançados (POAs) que são relativamente baratos e muito eficientes (GROMBONI *et al.*, 2010). Estes se baseiam na formação do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que é um agente altamente oxidante e reativo e responsável pela decomposição da matéria orgânica (GROMBONI *et al.*, 2010; GROMBONI *et al.*, 2007a; GROMBONI *et al.*, 2007b). Entre estes processos oxidativos, recentemente tem se destacado as reações Fenton e de Foto-Oxidação UV. A reação Fenton é caracterizada pela reação entre o ferro (Fe) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em meio ácido (GROMBONI *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2007) e a reação de Foto-Oxidação UV, se baseia na ação da radiação UV sobre a matéria orgânica presente em solução resultando na formação de espécies intermediárias como o oxigênio singlete, o peróxido de hidrogênio, os íons superóxidos, os radicais organoperoxila, os radicais hidroxilas, entre outros. A mineralização pela aplicação da Foto-Oxidação UV também pode envolver a adição de substâncias, as quais facilitam o processo de oxidação, como H_2O_2 , ozônio (O_3) e o persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004; GOLIMOWSKI e GOLIMOWSKA, 1996). Um outro método de preparo de amostra alternativo que vem se destacando recentemente na literatura é a digestão ácida assistida por ultrassom, a qual se baseia no fenômeno de cavitação, promovendo a extração sólido-líquido a partir de ondas ultrassônicas que geram numerosas bolhas de gás promovidas por um aparelho de ultrassom, sendo essas bolhas capazes de promover o rompimento de ligações e favorecer a formação de radicais livres (como $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{O}_2\text{H}$, H_2O_2 , entre outros), os quais são capazes de oxidar uma ampla variedade de compostos orgânicos presentes na matriz (BENDICHO *et al.*, 2012; KRUG, 2010; SANTOS e CAPELO, 2007).

Estes processos de preparo de amostra são muito utilizados no tratamento de resíduos com alto conteúdo de carbono devido a sua alta eficiência, baixo custo e o uso de reagentes de baixa toxicidade (CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004). Outras vantagens ainda são a utilização de equipamentos de baixo custo, maior rapidez, uso de baixas temperaturas e menor quantidade de reagentes o que torna o processo mais seguro e minimizam-se os riscos de perda do analito (CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Todavia, considerando todas as vantagens na utilização destes tipos de preparo de amostra estes tem sido pouco empregados na análise elementar de alimentos por FAAS. Estes fatos despertaram o interesse no desenvolvimento e validação de métodos analíticos alternativos mais rápidos e precisos para a análise de Mn, Zn, Fe e Mg em açúcar mascavo empregando-se as reações Fenton e de Foto-Oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom, e a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

Otimizar e validar metodologias analíticas de preparo de amostra para a determinação de Zn, Mn, Mg e Fe em açúcar mascavo por FAAS utilizando as reações Fenton e de Foto-Oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom .

1.2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar a preparação da amostra pela reação Fenton para análise de Mn em açúcar mascavo por FAAS utilizando-se planejamento de experimentos;
- Otimizar a preparação da amostra pela reação de Foto-Oxidação UV para análise de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS utilizando-se planejamento de experimentos;
- Otimizar a preparação da amostra pela digestão ácida assistida por ultrassom para análise de Fe em açúcar mascavo por FAAS utilizando-se ensaios univariados;
- Validar os métodos de FAAS otimizados para a determinação de Zn, Mn, Mg e Fe pela aplicação de diferentes testes estatísticos (teste-*t*, teste-*F* e regressão linear);
- Determinar os teores de Zn, Mn, Mg e Fe em amostras de açúcar mascavo de diferentes procedências pelos métodos de FAAS validados.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar teve sua origem na região leste da Indonésia e na Nova Guiné e, ao longo de muitos séculos, se espalhou por diversas ilhas do sul do Oceano Pacífico, Indochina, Arquipélago da Malásia e Bengala, aparecendo como planta produtora de açúcar na Índia Tropical. Os Persas foram os primeiros a desenvolver técnicas de produção do açúcar estabelecendo as “rotas do açúcar” entre os países asiáticos e africanos (DELGADO e AZEREDO CÉSAR, 1977).

No Brasil, os primeiros plantios de cana-de-açúcar iniciaram-se em São Paulo, em 1522 e, atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido da Índia, Tailândia e Austrália. As principais regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo ao país duas safras ao ano com produção de açúcar e etanol para os mercados interno e externo (ASSIS *et al.*, 2014). Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (ÚNICA), em 2015 o Brasil teve uma área plantada de cana-de-açúcar de, aproximadamente, 11 milhões de hectares, com produção de 632 mil toneladas de cana-de-açúcar e 35 mil toneladas de açúcar na safra 2014/2015 (UNICA, 2015). O Paraná, em 2015, teve uma área plantada de 678 mil hectares, com produção de 43 mil toneladas de cana-de-açúcar e quase 3,0 mil toneladas de açúcar na respectiva safra (UNICA, 2015).

A cana-de-açúcar é uma planta composta, em média, de 65 a 75% de água, sendo o seu principal componente a sacarose, que corresponde de 70 a 91% das substâncias sólidas solúveis. O caldo de cana ou garapa é o nome que se dá ao líquido extraído da cana-de-açúcar no processo de moagem. É um alimento muito energético, que dá origem a produtos como a rapadura, o melado e o açúcar mascavo. O caldo conserva todos os nutrientes da cana-de-açúcar, dentre eles íons metálicos (de 3,0 a 5,0%) como Fe, Ca, K, Na, P, Mg e Cl, além de vitaminas do complexo B e C (FAVA, 2004).

Antes de se realizar a colheita da cana-de-açúcar é importante a identificação do estágio de maturação da mesma, assim como, a quantidade de sacarose, pois quanto maior a quantidade deste carboidrato na cana-de-açúcar, maior será a produção por tonelada de cana (SILVA, AZEREDO CÉSAR e SILVA, 2003).

Ao chegar ao engenho a cana-de-açúcar é descarregada manualmente ou mecanicamente na moenda. As unidades melhor equipadas possuem facas de preparo que antecedem a operação de moagem. Nas unidades mais simples, a cana é colocada inteira diretamente na moenda. Após a operação de moagem, tem-se uma quantidade de bagaço originário da fibra da cana-de-açúcar que em parte é queimada nas caldeiras para a produção de vapor ou nas fornalhas dos tachos de concentração do caldo e, as sobras, geralmente são destinadas a alimentação bovina ou para compostagem juntando-se a ela as cinzas, o que servirá para adubação orgânica da cana destinada a obtenção de produtos orgânicos (SILVA, AZEREDO CÉSAR e SILVA, 2003).

O caldo obtido na moagem, passa pela primeira purificação que consiste na peneiragem, que separa a fração de bagacilho do caldo. Esse caldo é destinado à fase de purificação química e térmica, em que se faz a remoção das impurezas que floculam pela mudança de reação do meio e efeito da temperatura. Após, é realizada a etapa de concentração e cozimento do caldo até o ponto do produto que se deseja obter. Os produtos provenientes da cana-de-açúcar são altamente energéticos e de grande valor nutricional, devido aos açúcares e as demais substâncias que eles contêm, provenientes da própria cana-de-açúcar (SILVA, AZEREDO CÉSAR e SILVA, 2003).

Entre os produtos derivados da cana-de-açúcar, o açúcar e seus derivados como refinado, cristal e mascavo tem uma grande importância na economia brasileira (ASSIS *et al.*, 2014). Alguns destes açúcares, como o açúcar mascavo, vêm se destacando no mercado atual, por ser considerado um alimento saudável e assim o seu consumo tem aumentando significativamente a fim de melhorar a qualidade de vida.

2.2. Açúcar Mascavo

O açúcar mascavo ou também chamado de açúcar batido ou granulado, como é conhecido no Brasil, apresenta diferentes denominações em outros países, como por exemplo, no Perú, México e Chile é conhecido por *chancaca*, na Colômbia por *panela*, na Costa Rica por *piloncillo*, na Venezuela por *papelón*, na Índia por *gur*, nas Filipinas por *muscovado sugar* e por *black sugar* no Japão e Taiwan (CASTILLO ORTIZ e GANCHOZO MONCAYO, 2004).

A resolução 12/33 de 1978, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde, definiu açúcar como a sacarose obtida de cana-de-açúcar

por processos industriais adequados. O produto é designado “açúcar”, seguido da denominação correspondente ao tipo, como por exemplo, “açúcar cristal”, “açúcar refinado”, “açúcar demerara”, entre outras denominações. O açúcar para ser considerado como açúcar mascavo deve conter um mínimo de 90% de sacarose em sua composição (BRASIL, 1978).

O açúcar mascavo é um tipo de açúcar artesanal, ou seja, produzido geralmente em indústria de pequeno porte ou em empresa familiar. Este tipo de açúcar é produzido a partir do caldo de cana extraído pelo esmagamento dos colmos maduros da cana-de-açúcar e não é submetido a processos de clarificação do caldo, ou seja, não há operação suficiente para remover impurezas que poderiam estar presentes no caldo. Assim o produto pode ter um aspecto marrom claro a marrom escuro (Figura 2.1), em função do tipo de cana-de-açúcar colhida, sendo denso e pesado, com sabor semelhante à rapadura moída. É constituído de aglomerados de sacarose, glicose e frutose e demais componentes provenientes do caldo (ARAÚJO *et al.*, 2011; DELGADO e DELGADO, 1999).



Figura 2.1. Algumas amostras de açúcar mascavo comercializadas na cidade de Guarapuava-PR (Fonte: Arquivo pessoal).

O processo de produção do açúcar mascavo é similar ao empregado na produção da rapadura. A diferença está apenas na temperatura final da concentração do caldo, que deve ser maior para o açúcar mascavo. Antes de ser moída, a cana-de-açúcar deve passar por um processo de limpeza, como mostrado no item 2.1, permitindo que o caldo extraído seja isento de impurezas (BRASIL, 2004).

O caldo extraído, depois de peneirado para a retirada das impurezas grosseiras, é colocado em repouso para a decantação das impurezas menores, sendo então transferido para um ou mais tachos assentados em uma fornalha de alvenaria, para ser aquecido com a queima de lenha ou bagaço. Neste momento, outras impurezas emergem e são retiradas, geralmente, com o auxílio de uma concha ou de uma escumadeira. É importante salientar, que a retirada dessas impurezas que emergem no aquecimento do caldo, como os bagacilhos da cana e impurezas provenientes do solo, é de extrema importância para a produção de um açúcar mascavo de qualidade e com uma coloração mais clara (BRASIL, 2004).

Quando o caldo começa a apresentar uma maior consistência e uma coloração amarelada, tem-se a aproximação do ponto final de cozimento. O momento final é observado através do aspecto do caldo (amarelado e espesso) e através do uso de termômetros que indicam a temperatura que o mesmo apresenta (a temperatura final deve estar entre 120 e 122 °C) (SILVA, AZEREDO CÉSAR e SILVA, 2003). Em geral, as pequenas propriedades não possuem termômetros e os produtores visualizam o momento final do cozimento através da obtenção do ponto de bala dura, procedimento que consiste na retirada de uma colher de caldo e a colocação de algumas gotas em um prato de ferro ou alumínio com água fria. A massa resultante se transforma em uma bala de consistência dura, vítrea e quebradiça, indicando o final do cozimento e, o cheiro de queimado, também serve para indicar o ponto final (BRASIL, 2004).

Após o final do cozimento, a massa é retirada do tacho com o auxílio de uma concha e colocada em cochos de madeira, masseiras ou gamelas, onde é agitada com uma espátula de madeira ou sarrafo. Com a bateção, a massa se resfria e solidifica, assumindo a condição de grânulos bem finos e secos, que devem ser peneirados para obtenção de um produto homogêneo. Os grânulos que não passam pela peneira devem ser moídos em desintegradores (tipo forrageiro) e novamente peneirados (BRASIL, 2004).

Depois de finalizado o processo, o açúcar mascavo é embalado em sacos de polipropileno, pesado e armazenado em locais livres de umidade e calor em excesso, até o momento do consumo ou comercialização (BRASIL, 2004). A Figura 2.2 ilustra as etapas de preparação da cana-de-açúcar e a obtenção do açúcar mascavo.

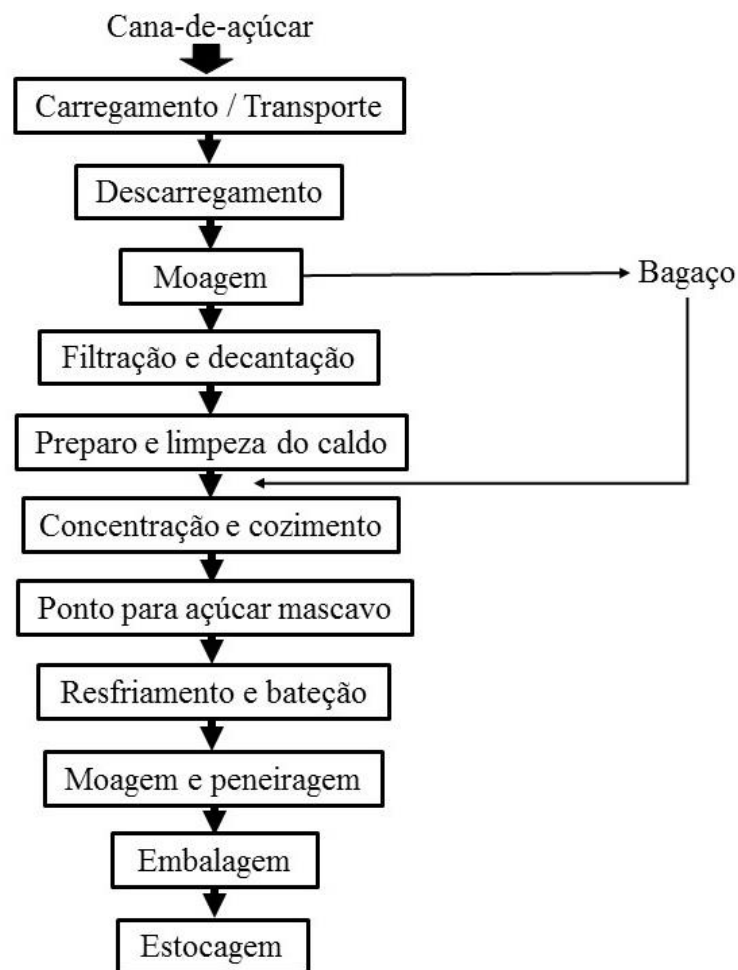


Figura 2.2. Fluxograma do processo de preparação da cana-de-açúcar e a obtenção do açúcar mascavo (Fonte: SILVA, AZEREDO CÉSAR e SILVA, 2003).

Segundo Lopes e Borges (1998), o açúcar mascavo apresenta em sua composição final, em relação aos sais minerais e componentes orgânicos, uma concentração próxima do caldo da cana-de-açúcar (LOPES e BORGES, 1998). É composto de sacarose e outros elementos como água, cinzas, proteínas e sólidos insolúveis, além da presença de vários minerais, aumentando os benefícios nutricionais deste tipo de açúcar (GUERRA e MUJICA, 2010).

O consumo de açúcar mascavo tem crescido devido à valorização de produtos naturais, especialmente sem aditivos químicos. Em relação a sua composição, que o torna um alimento altamente nutritivo, este tipo de açúcar pode substituir com vantagens o açúcar cristal e o refinado (BRASIL, 2004).

As diferenças entre o açúcar mascavo e o açúcar branco ocorrem desde as etapas iniciais de fabricação. O açúcar branco é obtido através de uma série de processos químicos

para o seu clareamento, que retiram praticamente todas as vitaminas e os minerais presentes no caldo da cana-de-açúcar (CASTILLO ORTIZ e GANCHOZO MONCAYO, 2004). Assim, a composição de minerais no açúcar branco é inferior em relação ao açúcar mascavo (LOPES e BORGES, 1998).

Pode-se considerar que o açúcar mascavo é um produto superior ao açúcar cristal, branco ou de refinaria, que se caracterizam apenas pelo seu poder adoçante e energético (DELGADO e DELGADO, 1999). Do ponto de vista nutricional, o açúcar mascavo se destaca em relação ao açúcar branco, pois em sua composição está presente uma maior quantidade de minerais e vitaminas, conforme mostra a Tabela 2.1 (EMATER, 1999; JAFÉ, 2015).

Tabela 2.1. Comparação do valor nutritivo (em 100 gramas) dos açúcares refinado e mascavo.

Açúcar	Calorias	Proteínas	Glicídios	Lipídios	Mn	Zn	Mg	Fe
		(g)	(g)	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
<i>Refinado</i>	398	-	99,50	-	0,00	0,02	0,00	0,06
<i>Mascavo</i>	356	0,40	90,60	0,50	0,80	0,61	65,51	4,98

(Fonte: EMATER, 1999; JAFÉ, 2015).

Além disso, o consumo de açúcar mascavo diminui a carga energética específica e sua composição não compromete a absorção de nutrientes pelo organismo, além de evitar a obesidade, o diabetes, diminuir sensivelmente as cáries dentárias e os danos à calcificação infantil, ajudando também no bom desempenho do sistema digestivo e das funções hepática e renal (BRASIL, 1976; SPEARS e KASSOUF, 1996). Assim, esse açúcar atende aos grupos de pessoas que possuem hábitos alimentares baseados na minimização ou eliminação de produtos químicos agregados, sendo recomendado muitas vezes, devido ao seu elevado teor de minerais essenciais na dieta de pessoas anêmicas (SILVA, AZEREDO CÉSAR e SILVA, 2003).

2.3. Minerais Essenciais

Os minerais são substâncias inorgânicas presentes em, praticamente, todos os tecidos e fluidos corporais, sendo necessários para a manutenção de certos processos físico-químicos

que são essenciais para a vida (GUPTA e GUPTA, 2014; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010). O corpo humano necessita de, aproximadamente, vinte minerais diferentes para funcionar corretamente. Os minerais reconhecidos como essenciais são divididos em dois grupos: os macrominerais, que são necessários em maiores quantidades no organismo (geralmente mais que 100 mg/dia) e são amplamente encontrados nos alimentos, os quais incluem cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), cloro (Cl) e potássio (K) e os microminerais, que são necessários em quantidades menores (geralmente menos que 100 mg/dia) e são encontrados nos alimentos em pequenas concentrações, os quais incluem ferro (Fe), zinco (Zn), iodo (I), selênio (Se), manganês (Mn), crômio (Cr), cobre (Cu), molibdênio (Mo), flúor (F), boro (B), cobalto (Co), silício (Si), alumínio (Al), arsênio (Ar), estanho (Sn), lítio (Li) e níquel (Ni) (SPADA *et al.*, 2010).

Muitos dos minerais essenciais são responsáveis por importantes funções no organismo, porém se presentes em concentrações superiores as necessárias, podem causar efeitos tóxicos e muitos dos efeitos observados nos casos de contaminação podem produzir sintomas comparáveis aos observados quando ocorrem deficiências dos minerais essenciais (FRAGA, 2005; TAVARES e CARVALHO, 1992). Como por exemplo, o Zn constitui em torno de $33 \mu\text{g g}^{-1}$ da massa corporal de um adulto, sendo o constituinte do plasma e de diversas enzimas envolvidas em várias funções fisiológicas, como a síntese de proteínas e o metabolismo energético e é considerado essencial para a divisão celular. É responsável pela reparação de tecidos e a cicatrização de feridas. Este elemento é fundamental, também, na ação da insulina, pois é um componente integrante da mesma. Tem sido demonstrado que o Zn pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento normais durante a gravidez, a infância e a adolescência (GUPTA e GUPTA, 2014; MILLIKAN, 2012; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010; FRAGA, 2005; NASCENTES *et al.*, 2004; ONIANWA *et al.*, 2001). A deficiência de Zn pode afetar o crescimento, o sistema imunológico, a cicatrização de feridas, os sentidos do paladar e do olfato e prejudicar a síntese do DNA. A absorção de Zn pode ser prejudicada pela alta ingestão de Fe. Contudo, o excesso de Zn pode resultar em cólicas, diarreia, náuseas, anemia e letargia. Pode também, afetar o equilíbrio e concentrações de Fe, Ca e P, bem como das vitaminas A, B1 e C (GUPTA e GUPTA, 2014; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010; FRAGA, 2005; ONIANWA *et al.*, 2001). A ingestão diária recomendada de Zn, segundo a ANVISA, é de 7,0 mg/dia (BRASIL, 2005b).

O Mn desempenha um papel importante no desenvolvimento dos ossos, cartilagens, gorduras, metabolismo dos carboidratos, regulação do açúcar no sangue, absorção de Ca e K e na cicatrização de feridas. É um elemento essencial para o crescimento normal, desenvolvimento, homeostase celular e para o desenvolvimento e funcionamento do cérebro. Encontra-se normalmente no cérebro em concentrações em partes-por-milhão e age como um cofator para inúmeras enzimas cerebrais (GUPTA e GUPTA, 2014; BOWMAN *et al.*, 2011; FRAGA, 2005; RABIN *et al.*, 1993). A sua deficiência no organismo pode contribuir para alguns defeitos de nascimento como ossos com malformação, pode prejudicar a fertilidade e causar sintomas como fraqueza. Pode afetar, também, a função do sistema nervoso central e o humor. Já o excesso de Mn no organismo pode afetar, principalmente, o sistema nervoso central, assim como a deficiência de Mn. A exposição excessiva de Mn pode levar a acumulação deste mineral no cérebro e tem sido associada com a disfunção do sistema de gânglios basais que causa um tipo de doença neurológica grave. O excesso é caracterizado também, por um conjunto de sintomas que se assemelham a doença de Parkinson, incluindo anorexia, apatia e dores musculares e articulares. Também pode causar perda de memória, comportamento compulsivo, deficiência visual, ilusões, delírios e desorientação. Pode afetar os órgãos vitais, o cérebro e os pulmões. Níveis elevados de Mn no cérebro têm sido associados ao comprometimento da homeostase do Fe, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e alterações nas condições homeostáticas de outros elementos (GUPTA e GUPTA, 2014; BOWMAN *et al.*, 2011; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010; ASCHNER, 2000; RABIN *et al.*, 1993). A ingestão diária recomendada de Mn, segundo a ANVISA, é de 2,3 mg/dia (BRASIL, 2005b).

O Mg é o quarto elemento mais abundante no corpo humano e apresenta diversas funções. Aproximadamente 50% da quantidade total de Mg no corpo é encontrada nos ossos. A outra metade é encontrada nas células de tecidos e nos órgãos e 1% de Mg é encontrado no sangue. Este mineral apresenta um papel importante no sistema nervoso, na função muscular, na saúde dos ossos e para os dentes. É importante também, para a produção de proteínas e produção e transporte de energia ao longo do corpo. Tem papel importante na redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares e no desenvolvimento de doenças crônicas, como arteriosclerose, diabetes, obesidade, síndrome metabólica e hipertensão. É um componente ativo de várias enzimas de transferência. O estado de saúde do sistema digestivo e dos rins são influenciados, significativamente, pela concentração de Mg (GUPTA e

GUPTA, 2014; MILLIKAN, 2012; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010). A deficiência deste mineral pode ser a causa da maioria dos problemas de depressão e de saúde mental. Pode contribuir significativamente para a ocorrência de doenças crônicas, tais como aterosclerose, hipertensão, osteoporose, diabetes mellitus, câncer e para o risco de doenças cardiovasculares, além de sintomas como vômitos, diarreias crônicas e tremores generalizados. Doenças gastrointestinais, como a doença de Crohn, podem prejudicar a absorção de Mg pelo organismo. Estes distúrbios podem esgotar as reservas de Mg do corpo, resultando na deficiência deste mineral (GUPTA e GUPTA, 2014; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010). A ingestão diária recomendada de Mg, segundo a ANVISA, é de 260 mg/dia (BRASIL, 2005b).

Em relação ao Fe, o corpo humano contém, aproximadamente, 4,5 g deste elemento. Cerca de 65% deste é ligado à hemoglobina, 10% é constituinte da mioglobina, citocromos e enzimas e 20 a 30% está relacionado ao armazenamento. É um mineral essencial necessário para a produção de hemoglobina no sangue e mioglobina nos músculos. O corpo humano necessita de Fe para a produção de várias proteínas do sangue. Os benefícios a saúde incluem principalmente o transporte de oxigênio nas células do sangue. Na respiração celular é um componente essencial das enzimas envolvidas na oxidação biológica. É necessário para a mielinização adequada da medula espinhal e é um cofator para as enzimas envolvidas na síntese dos neurotransmissores (GUPTA e GUPTA, 2014; MILLIKAN, 2012; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2009; FRAGA e OTEIZA, 2002). A deficiência crônica de Fe causa anemia, com redução do número de células vermelhas e, conseqüentemente, diminuição da oxigenação das células do corpo. Pode, ainda, resultar em sintomas como fadiga e fraqueza corporal. Pode afetar o crescimento em crianças. Além disso, a deficiência de Fe está associada a alterações em muitos processos metabólicos que podem causar impacto no funcionamento do cérebro. O excesso de Fe durante a gravidez representa um alto risco de parto prematuro, feto com retardo de crescimento e baixo peso ao nascer. Elevados teores de Fe no tecido têm sido associados também a várias doenças patológicas como, doenças do fígado e do coração, desordens neurodegenerativas, diabetes, anormalidades hormonais e anormalidades do sistema imune. Além disso, o excesso deste elemento também tem sido relacionado a alguns distúrbios neurológicos como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a neuro-degeneração (GUPTA e GUPTA, 2014; SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2009; FRAGA, 2005; FRAGA

e OTEIZA, 2002). A ingestão diária recomendada de Fe, segundo a ANVISA, é de 14 mg/dia (BRASIL, 2005b).

Tendo em vista o conhecimento das funções que os minerais essenciais podem desempenhar no organismo, tanto quando presentes em excesso quanto quando em deficiência, torna-se importante monitorar os níveis desses minerais (Mn, Zn, Fe e Mg) em alimentos, principalmente daqueles que são utilizados, muitas vezes, para suprir as necessidades nutricionais, como é o caso do açúcar mascavo. Para esta finalidade, a quantificação de minerais essenciais em alimentos já tem sido rotineiramente realizada em laboratórios através da espectrometria de absorção atômica, destacando-se, principalmente, a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

2.4. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

De acordo com Ribeiro, Arruda e Cadore (2002), a espectrometria de absorção atômica (AAS - do inglês Atomic Absorption Spectrometry) revolucionou a determinação de metais durante as décadas de 1950 e 1960. Esta técnica foi, basicamente, desenvolvida e proposta por Alan Walsh, no início dos anos 50. No início, houve certa descrença entre os pesquisadores espectroscopistas da época que, só utilizavam, praticamente, o espectro de emissão atômica para as análises químicas. Entretanto, a utilização do espectro de absorção atômica que, segundo o seu criador, era uma técnica que prometia ser muito promissora, chamou a atenção do russo Boris V. L'vov que, além de confirmar a validade dos experimentos realizados por Walsh, dedicou-se na sua utilização e aperfeiçoamento (RIBEIRO, ARRUDA e CADORE, 2002). Em meados de 1960, a empresa Techtron Pty Ltda localizada na Austrália, fabricou o primeiro instrumento baseado em seu projeto, a qual permaneceu ao longo de muitos anos fabricando-o. Mais tarde a Varian Inc. e a Agilent Technologies nos Estados Unidos passaram a fabricar até os dias atuais o instrumento baseado na tecnologia de Walsh (MILLIKAN, 2012).

Essa técnica é muito utilizada para a determinação quantitativa de íons metálicos em uma ampla variedade de amostras, como materiais biológicos (tecidos e fluídos), amostras ambientais (águas, solos, sedimentos e plantas), alimentos, amostras geológicas, entre outras, de maneira rápida, simples e precisa (MILLIKAN, 2012; KRUG, NÓBREGA e OLIVEIRA, 2004).

Segundo Krug, Nóbrega e Oliveira (2004), a espectrometria de absorção atômica se baseia na medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental. Um espectrômetro de absorção atômica, como o representado na Figura 2.3, é composto basicamente de uma fonte de radiação (na qual se promove a excitação de elementos capazes de emitir radiação na região do visível e do ultravioleta do espectro eletromagnético que pode ser uma lâmpada de catodo oco (HCL), fontes de espectros contínuos e lâmpadas de descarga sem eletrodos (EDL)), um sistema de atomização (o qual se baseia no processo de formação de átomos no estado fundamental que podem ser obtidos em chama, eletrotermicamente em forno de grafite, ou outros sistemas alternativos), um conjunto monocromador (que tem a função de separar a linha espectral de interesse das outras linhas emitidas pela fonte de radiação), um detector (que mede a intensidade de luz) e um processador (que transforma o sinal recebido pelo detector em dados gráficos) (KRUG, NÓBREGA e OLIVEIRA, 2004).

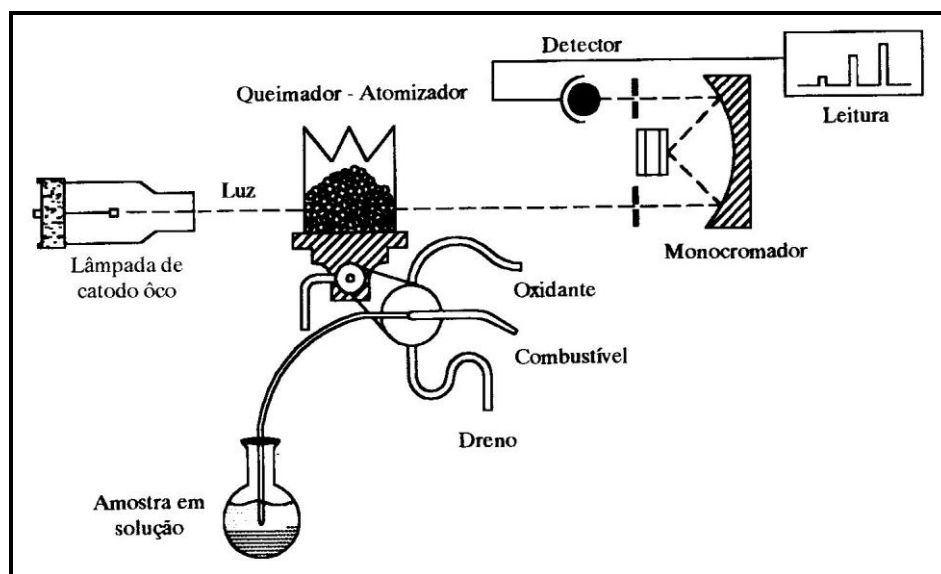


Figura 2.3. Esquema de um espectrômetro de absorção atômica (Fonte: CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

Pode-se considerar a espectrometria de absorção atômica como uma técnica bastante simples. Ainda hoje, após 45 anos da primeira publicação, é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de baixas concentrações de íons metálicos. Além disso, a utilização de diferentes formas de atomização (chama, atomização eletrotérmica, entre outras) permite a determinação de vários elementos de uma amostra (RIBEIRO, ARRUDA e CADORE, 2002).

2.4.1. Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS)

A espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) é uma das técnicas espectrométricas mais antigas, utilizada desde 1955 ano em que foi introduzida, e que ainda permanece sendo amplamente utilizada em laboratórios de análises de rotina (WELZ e SPERLING, 1999). As análises utilizando a FAAS são realizadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (Figura 2.3), um equipamento geralmente utilizado para análise elementar em níveis de mg L^{-1} , ou seja, quando se pretende determinar poucos íons metálicos em um grande número de amostras (VANDERCASTELLE e BLOCK, 1993).



Figura 2.4. Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (Fonte: Arquivo pessoal).

Segundo Skoog, Holler e Nieman (2002), na FAAS a amostra líquida é introduzida no atomizador através de uma câmara de nebulização a qual converte o líquido em um aerossol. Esse aerossol é misturado com o gás comburente e oxidante antes de atingir o queimador. O nebulizador faz com que a amostra seja aspirada através de um tubo capilar por um fluxo de alta pressão de um gás em torno do tubo. Esse gás em alta velocidade divide o líquido em gotas de diversos tamanhos. As gotas se dispersam e são selecionadas através de um spoiler, em que as maiores são impedidas de atingir o queimador, sendo eliminadas através de um dreno. E as gotículas que atingem a chama evaporam e, o sólido que resta vaporiza, liberando átomos no estado gasoso. A concentração desses átomos liberados é determinada por absorção da radiação, diretamente relacionada com a quantidade de átomos presentes (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Esta técnica é amplamente utilizada, principalmente, devido a sua simplicidade, eficácia e um custo relativamente baixo de manutenção, além de ser uma técnica capaz de distinguir diferentes elementos químicos em matrizes complexas (WELZ e SPERLING, 1999). Porém, não é uma técnica recomendada para a determinação de baixas concentrações, como por exemplo $\mu\text{g L}^{-1}$, em virtude de sua baixa sensibilidade. Desta maneira, a determinação de íons metálicos em baixas concentrações pode ser realizada utilizando-se técnicas mais sensíveis, como por exemplo, a Espectrometria de Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GFAAS) (MARTÍN-ESTEBAN *et al.*, 1999).

2.5. Métodos de Preparo de Amostra

A análise elementar da maioria das matrizes complexas, como é o caso do açúcar mascavo, especialmente quando são empregadas as técnicas de espectrometria atômica para a detecção, frequentemente requer uma etapa de solubilização/decomposição total ou parcial da amostra antes da análise instrumental (CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003; MAGALHÃES e ARRUDA, 1998). Esta pode ser considerada como a principal e a mais complexa etapa preliminar de análise. Em geral, é nesta fase que se consome mais tempo, representando 61% do tempo total da análise e, também, o ponto em que se pode cometer mais erros, ou seja, ela pode contribuir para 30% do erro total da análise, além de ser a etapa de maior custo (OLIVEIRA, 2003; ARRUDA e SANTELLI, 1997; DUTRA, SANTOS e COELHO, 2004).

Normalmente, a solubilização/decomposição da matriz é realizada por dois métodos convencionais de preparo de amostra, a digestão por via seca e a digestão por via úmida. Porém, tais métodos podem apresentar uma série de inconvenientes, como elevado tempo de preparo de amostra, utilização de grandes volumes de reagentes e riscos de contaminação e perdas do analito de interesse por volatilização (SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010; POHL, 2009; KORN *et al.*, 2008; DUTRA, SANTOS e COELHO, 2004; CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003; OLIVEIRA, 2003; BULDINI, RICCI e SHARMA, 2002; MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; ARRUDA e SANTELLI, 1997). Com o intuito de minimizar esses inconvenientes e tornar mais rápida e precisa a análise elementar de matrizes complexas como o açúcar mascavo, que vem sendo desenvolvidas metodologias alternativas de preparo de amostra que apresentam simplicidade, rapidez, utilizam pequenos volumes de reagentes, permitem o tratamento de um grande número de amostras, além de proporcionarem resultados

precisos e exatos (ARRUDA e SANTELLI, 1997; DUTRA, SANTOS e COELHO, 2004; CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004). Assim, algumas metodologias de preparo de amostras vêm se destacando como metodologias alternativas as convencionais por apresentarem essas vantagens como é o caso das reações Fenton e de Foto-Oxidação UV e da digestão ácida assistida por ultrassom (CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003).

2.5.1. Métodos de Preparo de Amostra Adotados como Referência

2.5.1.1. Digestão por Via Seca

É considerado um método convencional de preparo de amostra, talvez o mais simples para a digestão ou decomposição de amostras biológicas e orgânicas. Baseia-se na queima da amostra com o oxigênio do ar, obtendo-se um resíduo inorgânico, na forma de cinzas, solúvel em ácido diluído. A amostra é colocada em um cadinho (geralmente de porcelana) e aquecida em atmosfera ambiente até que todo o material orgânico seja carbonizado, resultando apenas em um resíduo inorgânico não volátil. O oxigênio atmosférico atua como agente oxidante e o resíduo proveniente da queima consiste de óxidos metálicos, sulfatos não voláteis, fosfatos, silicatos, entre outros. O procedimento de digestão é conduzido em um forno tipo mufla, ajustando-se a uma temperatura suficientemente alta para que ocorra a completa decomposição da amostra em um período de tempo razoável, e procurando garantir que não ocorram perdas do analito por volatilização. A temperatura conveniente para a decomposição da matéria orgânica, geralmente, encontra-se entre 450 e 550 °C (HOENIG e KERSABIEC, 1996; NOGUEIRA *et al.*, 2005; KRUG, 2010).

Este método apresenta como vantagens a não utilização de solução de ácidos oxidantes concentrados e a possível utilização de massas elevadas de amostras, o que permite a determinação de elementos presentes em baixas concentrações (HOENIG e KERSABIEC, 1996; NOGUEIRA *et al.*, 2005). Porém, apesar deste método ser relativamente simples, há uma série de limitações, pois alguns elementos podem ser convertidos em uma forma volátil, devido a alta temperatura usada para a completa decomposição da amostra, os quais podem ser perdidos parcialmente ou até mesmo completamente (HOENIG e KERSABIEC, 1996; KRUG, 2010). Além da baixa velocidade analítica, do alto consumo de energia elétrica, pode-se destacar também, que o esmalte do cadinho de porcelana, pode reagir com silicatos,

fosfatos e óxidos presentes na amostra, assim o analito de interesse pode reagir ficando aderido nas paredes do recipiente e, desse modo, ser perdido neste tipo de pré-tratamento da amostra (HOENIG e KERSABIEC, 1996; NOGUEIRA *et al.*, 2005; KRUG, 2010).

2.5.1.2. Digestão por Via Úmida

A digestão ou decomposição por via úmida em frascos abertos é um dos métodos mais antigos e mais usados para a digestão de amostras orgânicas e inorgânicas. A digestão ocorre a partir do aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado; geralmente são usados nesse método o ácido nítrico (HNO_3), o ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou o ácido perclórico (HClO_4), individualmente ou combinados uns com os outros ou, também, a mistura desses ácidos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NOGUEIRA *et al.*, 2005; KRUG, 2010).

Se os ácidos utilizados forem suficientemente oxidantes e se o aquecimento for feito a temperaturas elevadas durante um período de tempo adequado torna-se possível oxidar completamente a maioria das amostras a partir desse método de digestão. Os elementos a serem determinados ficam na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriadas para a análise (NOGUEIRA *et al.*, 2005; KRUG, 2010).

A digestão por via úmida é útil para a determinação de baixas concentrações de elementos em diversos tipos de amostras, porque muitos dos analitos de interesse são convertidos em cátions inorgânicos simples não voláteis, que permanecem no meio ácido. Porém, alguns elementos também podem ser perdidos parcialmente ou até mesmo completamente por volatilização. A principal vantagem da digestão por via úmida em relação a digestão por via seca, são as menores temperaturas empregadas, o que diminui os riscos de perdas por volatilização (NOGUEIRA *et al.*, 2005; KRUG, 2010).

2.5.2. Métodos Analíticos Alternativos de Preparo de Amostra

2.5.2.1. Processo Oxidativos Avançados (POAs)

Tendo em vista que os métodos tradicionais de preparo de amostra apresentam uma série de inconvenientes, que novas propostas analíticas vêm sendo desenvolvidas na tentativa

de minimizar estes inconvenientes e tornar mais rápida, precisa e exata a análise de minerais, principalmente no caso de matrizes complexas como o açúcar mascavo. Entre os métodos de preparo de amostra alternativos destacam-se os Processos Oxidativos Avançados (POAs), os quais incluem métodos que são relativamente baratos e muito eficientes na degradação da matéria orgânica (GROMBONI *et al.*, 2010; GROMBONI *et al.*, 2007a; GROMBONI *et al.*, 2007b).

Os POAs são técnicas de preparo de amostra as quais apresentam como característica comum a geração dos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$). Esses radicais são considerados como espécies ativas responsáveis pela degradação da matéria orgânica, isso devido ao seu alto potencial de oxidação (2,8V) o qual é menor apenas que o do flúor (3,0V). Eles são capazes de oxidar a maioria dos compostos orgânicos em dióxido de carbono (CO_2), água e íons inorgânicos, através de reações de degradação (GAMA, 2012; GROMBONI *et al.*, 2010; GOMES, 2009; BRITO e RANGEL, 2008; GROMBONI *et al.*, 2007a; GROMBONI *et al.*, 2007b; PAPADOPOULOS, FATTA e LOIZIDOU, 2007). A formação dos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) pode ainda ser acelerada pela presença de alguns oxidantes fortes ou a combinação deles, como o ozônio (O_3), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ferro (Fe), semicondutores, como o dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO) e a irradiação ultravioleta (UV) (Tabela 2.2.) (CATALKAYA e KARGI, 2007; TEIXEIRA e JARDIM, 2004). Os POAs, como métodos de preparo de amostra, apresentam algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais como menor consumo de energia, permitindo assim, a redução de custos; utilização de baixas concentrações de reagentes químicos, as quais resultam em baixa toxicidade; utilização de baixas temperaturas; métodos de fácil execução, exigindo a mínima habilidade do operador; além da preparação da amostra ser relativamente rápida e os riscos de perdas do analito de interesse e o perigo oferecido para o analista são menores que os dos métodos tradicionais (GROMBONI *et al.*, 2007a; TEIXEIRA e JARDIM, 2004; CAPELO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Tabela 2.2. Principais Processos Oxidativos Avançados (POAs).

Processo	Reagentes
<i>Ozonização</i>	O ₃ /H ₂ O ₂
	O ₃ /UV
	O ₃ /H ₂ O ₂ /UV
<i>Fenton</i>	Fe/H ₂ O ₂
<i>Foto-Fenton</i>	Fe/H ₂ O ₂ /UV
<i>Foto-Oxidação UV</i>	H ₂ O ₂ /UV
<i>Fotocatálise</i>	TiO ₂ /UV
	TiO ₂ /H ₂ O ₂ /UV

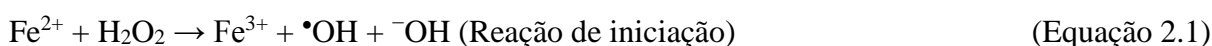
(Fonte: GAMA, 2012).

Dentre esses processos, destacam-se nesse trabalho as reações Fenton (Fe/H₂O₂) e de Foto-Oxidação UV (H₂O₂/UV) como métodos alternativos de preparo de amostra para a análise elementar de açúcar mascavo por FAAS.

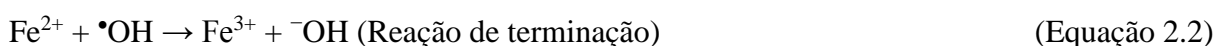
2.5.2.1.1. Reação Fenton

A reação Fenton foi descoberta pelo pesquisador Henry John Horstman Fenton em 1894, quando ele concluiu que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) poderia ser ativado por íons ferro (Fe) na oxidação do ácido tartárico (C₄H₆O₆), mas sua aplicabilidade só foi reconhecida em 1930, quando foi proposto o mecanismo baseado no radical hidroxila (\bullet OH) (GAMA, 2012; BRITO e RANGEL, 2008).

Esse processo está baseado na formação dos radicais hidroxila (\bullet OH) provenientes da decomposição do H₂O₂ catalisada por Fe²⁺ em meio ácido de acordo com a Equação 2.1 (GAMA, 2012; TEIXEIRA e JARDIM, 2004).



Na ausência de um substrato, o radical hidroxila (\bullet OH) formado na reação anterior, oxida outro íon Fe²⁺ dando origem aos íons Fe³⁺ e hidroxila ($\text{}^-\text{OH}$) de acordo com a Equação 2.2 (GAMA, 2012; TEIXEIRA e JARDIM, 2004).



Os íons Fe^{3+} formados podem decompor o H_2O_2 a H_2O e O_2 , de acordo com as Equações 2.3 a 2.7 (GAMA, 2012; TEIXEIRA e JARDIM, 2004).



É importante ressaltar que estas reações dependem da acidez do meio reacional. É necessário um meio ácido para que a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) seja eficaz e, assim, seja garantida a máxima formação dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (GAMA, 2012; GOMES, 2009; PAPADOPOULOS, FATTA e LOIZIDOU, 2007).

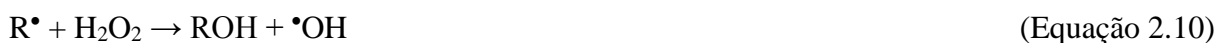
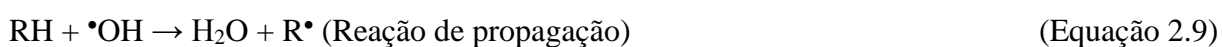
De acordo com estudos realizados sobre a reação Fenton, estes demonstraram que o pH ideal para a máxima eficiência do processo situa-se entre 2,5 e 3,0. Em valores altos de pH, o íon Fe^{3+} pode precipitar na sua forma hidroxilada de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, que é pouco solúvel em água, diminuindo assim, a interação do íon com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, conseqüentemente, a produção dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Já em valores muito baixos de pH, a alta concentração de íons H^+ pode promover o sequestro dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), reduzindo assim, a eficiência da reação, de acordo com a Equação 2.8 (GAMA, 2012).



Além do Fe^{3+} ser a espécie predominante em pH próximo a 2,0, este apresenta baixa absorvidade, não contribuindo para a geração de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (GAMA, 2012).

A formação do radical hidroperoxila (HO_2^\bullet) é indesejada no processo, pois o potencial de redução dessa espécie é menor que o potencial de redução do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Isto ocorre quando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está em excesso no meio, então a velocidade da reação entre o Fe^{2+} e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Equação 2.1) é menor que a velocidade da reação de sequestro do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) pela molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Equação 2.7), sendo favorável esta última reação. Qualquer reação que

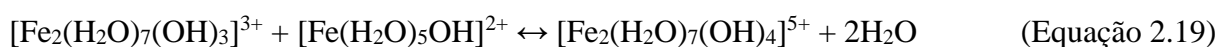
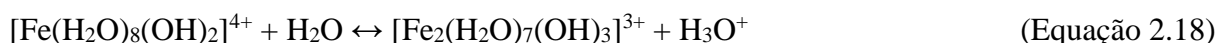
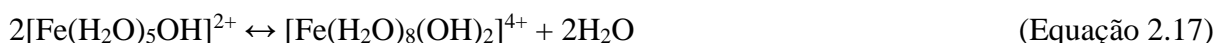
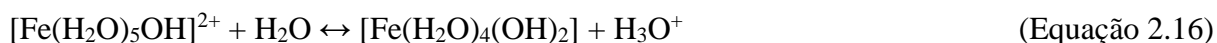
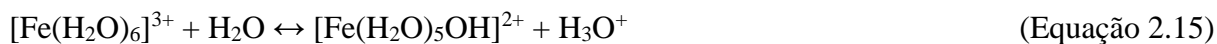
ocorra simultaneamente a reação principal (Equação 2.1), ou seja, que diminua a disponibilidade de radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) no meio reduz a degradação do substrato alvo, diminuindo assim a eficiência da reação Fenton (GAMA, 2012). Além disso, os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) formados podem reagir adicionando-se a anéis aromáticos e heterocíclicos em determinadas condições do meio reacional, como na presença de substratos orgânicos (RH), com o excesso de íons ferrosos (Fe^{2+}) e em pH baixo. Como podem também extrair um átomo de hidrogênio, dando início a reações radicalares em cadeia de acordo com as Equações 2.9 a 2.11 (GOMES, 2009; NEYENS e BAEYENS, 2003).



Os radicais livres orgânicos produzidos podem ser oxidados pelos íons férricos (Fe^{3+}) ou reduzidos pelos íons ferrosos (Fe^{2+}) ou ainda dimerizados de acordo com as Equações 2.12 a 2.14 (GOMES, 2009; NEYENS e BAEYENS, 2003).



Os íons férricos (Fe^{3+}) formados podem ainda reagir com a água formando uma série de hidroxio-aquo-complexos, como mostrado nas Equações 2.15 a 2.19 (GOMES, 2009; NEYENS e BAEYENS, 2003).



Esses complexos apresentam a capacidade de coagulação da reação Fenton. Os sólidos dissolvidos são capturados e precipitados. Durante a etapa de oxidação do processo é possível notar a grande quantidade de pequenos flocos. E como esses flocos são de difícil remoção, pode-se recorrer a coagulação química através do uso de polímeros para a eliminação dos mesmos (GOMES, 2009; TEIXEIRA e JARDIM, 2004; NEYENS e BAEYENS, 2003).

A reação Fenton pode ter tratamento diferente dependendo da relação/concentração $(\text{H}_2\text{O}_2)/(\text{Fe}^{2+})$. Assim, se a concentração de íons ferrosos (Fe^{2+}) for superior a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o processo tenderá para o efeito de coagulação química. E o inverso, ou seja, se a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) for superior a concentração dos íons ferrosos (Fe^{2+}), o processo tenderá para a oxidação química (GOMES, 2009; NEYENS e BAEYENS, 2003).

A reação de oxidação representada pela Equação 2.12 compete tanto com a reação de terminação (Equação 2.2) quanto com a reação de propagação (Equação 2.9). Essa competição entre o Fe^{2+} , o RH e o Fe^{3+} pelo radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), leva a decomposição ineficaz do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), limitando a oxidação dos compostos orgânicos. Portanto, para que se obtenha a máxima eficiência da reação Fenton é de extrema importância considerar as concentrações dos reagentes, ou seja, dos íons ferrosos (Fe^{2+}), dos íons férricos (Fe^{3+}), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, também, as características da reação como o pH, a temperatura e a concentração de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em solução (GOMES, 2009; NEYENS e BAEYENS, 2003).

A reação Fenton, como método de preparo de amostra, apresenta algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais como a utilização de reagentes de baixo custo e ambientalmente seguros, como por exemplo o ferro (Fe), que é um elemento atóxico e abundante na natureza, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um composto de fácil manuseio e se decompõe em oxigênio (O_2) e água (H_2O). Não há limitações de transferência de massa devido à natureza homogênea da reação e a remoção dos compostos presentes é fácil. Além disso, outras características interessantes são o fato da oxidação ser eficiente em condições brandas de reação, como a temperatura e pressão ambiente, as quais simplificam a aplicação desse processo e minimizam as possíveis perdas do analito de interesse por volatilização e a rapidez em relação ao tempo de análise quando comparado com os métodos

tradicionais (GAMA, 2012; POHL, 2009; MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; HUANG, DONG e TANG, 1993).

2.5.2.1.2. Reação de Foto-Oxidação UV

A reação de Foto-Oxidação UV foi utilizada primeiramente como um processo de digestão para a determinação de carbono, nitrogênio e fósforo em amostras de água. E a primeira aplicação como método de preparo de amostra, foi realizada em 1975 para a determinação de metais (BRANDÃO, 2010). Atualmente, a reação de Foto-Oxidação UV tem sido amplamente estudada e utilizada para a análise de metais em diversos tipos de matrizes, sendo a espectrometria de absorção atômica uma das principais técnicas usadas para a determinação (BRANDÃO, 2010).

A reação de Foto-Oxidação UV se baseia na combinação da radiação ultravioleta (UV) com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e pode ser considerada como um dos processos oxidativos avançados (POAs) mais eficientes para a degradação de compostos orgânicos (CATALKAYA e KARGI, 2007). A degradação de algumas moléculas orgânicas pode ocorrer somente através da ação da radiação UV, mas a combinação H_2O_2/UV torna o processo ainda mais eficiente do que a utilização de cada um deles separadamente, pois ocorre maior formação dos radicais hidroxilas ($\bullet OH$) (MACHADO, 2007; TAMBOSI, 2005).

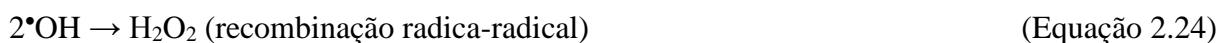
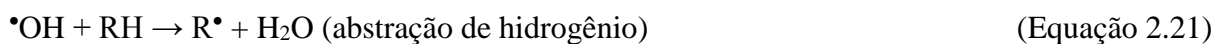
A radiação ultravioleta está situada entre os raios-X e a luz visível do espectro eletromagnético na faixa de 40 a 400 nm de comprimento de onda (λ). A Foto-Oxidação UV geralmente utiliza lâmpadas de mercúrio de baixa ou média pressão. As lâmpadas de baixa pressão são essencialmente monocromáticas e seu espectro consiste de uma linha com $\lambda = 253,7$ nm. A eficiência de conversão da potência em radiação ultravioleta (UV) destas lâmpadas é de cerca de 40%, sendo melhor do que as lâmpadas de média e alta pressão. No entanto, apresentam uma menor potência, que é de no máximo 60 W (BRANDÃO, 2010). Já as lâmpadas de média ou alta pressão apresentam um espectro de emissão caracterizado por linhas mais alargadas e um fundo contínuo que cobre toda a região ultravioleta. Apesar de apresentarem potência nominal aproximadamente uma ordem de grandeza maior que as de baixa pressão, estas lâmpadas convertem em luz UV somente cerca de 30% da potência elétrica consumida. Assim, como a absorção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é máxima a 220 nm, o correto seria o uso de lâmpadas de Xe/Hg, que são lâmpadas de alta pressão e que

emitem na faixa de 210-240 nm, mas que são relativamente mais caras do que as lâmpadas de baixa pressão (BRANDÃO, 2010).

De acordo com Legrini, Oliveros e Braun (1993), o mecanismo da Foto-Oxidação UV se baseia na quebra da molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sob a ação da radiação UV em radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$), com um rendimento de dois radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) para cada molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como mostrado na Equação 2.20.



Os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) formados (Equação 2.20) na presença de um substrato orgânico podem reagir a partir de três mecanismos diferentes, sendo eles a abstração de hidrogênio, a adição eletrofílica e a transferência de elétrons, podendo ocorrer também, a recombinação radical-radical, resultando na formação de uma série de espécies intermediárias, como representado nas Equações 2.21 a 2.24 (MACHADO, 2007; LEGRINI, OLIVEROS e BRAUN, 1993).



A eficiência da Foto-Oxidação UV depende de alguns fatores, principalmente do pH, da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do tempo de irradiação UV. A formação dos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é altamente afetada pelo pH do meio reacional, assim como, a reatividade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também depende do pH. Em meio alcalino pode ocorrer uma possível diminuição do processo de degradação da matéria orgânica devido à redução da concentração de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$); isto pode ocorrer devido ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sofrer foto-decomposição em água e oxigênio como é representado na Equação 2.25 (BORGHEI e HOSSEINI, 2008; MURUGANANDHAM e SWAMINATHAN, 2004).



Em meio alcalino também podem ser formadas espécies oxidantes como ânions hidroperoxila (HO_2^-) que não são favoráveis, pois estes podem reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e com os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) diminuindo a eficiência do processo de degradação, como representado nas Equações 2.26 e 2.27 (MURUGANANDHAM e SWAMINATHAN, 2004).



A concentração inicial de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) desempenha um papel muito importante para a geração dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) para a degradação de compostos orgânicos. À medida que aumenta a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aumenta, conseqüentemente, a formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Porém, o excesso deste reagente pode ligeiramente retardar a taxa de reação devido à formação de radicais hidroperoxila ($\text{HO}_2\bullet$) (Equações 2.28 e 2.29), sendo estes radicais menos reativos do que os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ocorrendo o consumo dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), diminuindo assim, a probabilidade de oxidação do substrato orgânico (BORGHEI e HOSSEINI, 2008; MURUGANANDHAM e SWAMINATHAN, 2004).



Concentrações baixas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também não são favoráveis, pois uma baixa concentração deste reagente não permite a geração de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) em quantidade suficiente e a degradação da matéria orgânica torna-se limitada (MURUGANANDHAM e SWAMINATHAN, 2004).

O tempo de irradiação UV também está relacionado com a eficiência na degradação da matéria orgânica. A energia da irradiação UV é absorvida pelas moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerando os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Assim, quanto maior o tempo de irradiação maior será a eficiência na degradação da matéria orgânica (BORGHEI e HOSSEINI, 2008).

Assim, é de extrema importância otimizar a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para garantir que o mesmo não esteja em baixa concentração ou em excesso. Realizar, também, o ajuste do pH e o tempo de irradiação UV ideal para se obter a máxima eficiência do processo de degradação desejado.

A Foto-Oxidação UV apresenta algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais de preparo de amostra, tais como: menor risco de contaminação da amostra, eliminação ou redução de perdas de analitos voláteis, menores quantidades de reagentes, as condições mais brandas para a mineralização da amostra, realização do processo a baixas temperaturas e pH levemente ácido e utilização de equipamentos de baixo custo (BRANDÃO, 2010).

2.5.2.2. Digestão Ácida Assistida por Ultrassom

As ondas ultrassônicas de acordo com Krug (2010) foram usadas inicialmente em métodos de análise de gases, para a aceleração da decomposição eletrolítica de íons metálicos em solução na eletroquímica e para a desgaseificação de soluções (KRUG, 2010). Na última década, os ultrassons têm sido considerados como ferramentas eficazes nos laboratórios analíticos, sendo a principal aplicação para a degradação de compostos orgânicos presentes nos mais diversos tipos de matrizes, ou seja, os ultrassons vêm sendo muito empregados na química analítica com a finalidade de pré-tratamento da amostra (BENDICHO *et al.*, 2012).

De acordo com Krug (2010), os ultrassons são ondas mecânicas que se propagam em meios materiais (geralmente sólido-líquido) em ciclos consecutivos de rarefação e compressão a frequências maiores que 16 kHz. A digestão de amostras assistida por ultrassom é baseada no fenômeno chamado de cavitação, sendo este o principal fator que promove a extração sólido-líquido. Esse fenômeno ocorre quando, em certas condições, o líquido é exposto as ondas ultrassônicas gerando numerosas bolhas de gás. Estas são formadas devido a passagem de uma onda acústica de alta potência no meio líquido irradiado (KRUG, 2010; SANTOS e CAPELO, 2007). As dimensões dessas bolhas aumentam e diminuem nas consecutivas fases de rarefação e compressão da onda acústica que se propaga através do meio líquido até, finalmente, sofrerem implosão, de tal maneira, que elas podem ser consideradas como micro reatores, os quais podem atingir temperaturas próximas a 5000 °C e pressões de 1,000 atm no momento do colapso. A Figura 2.4, ilustra o esquema de formação

das bolhas de cavitação até o momento da implosão.

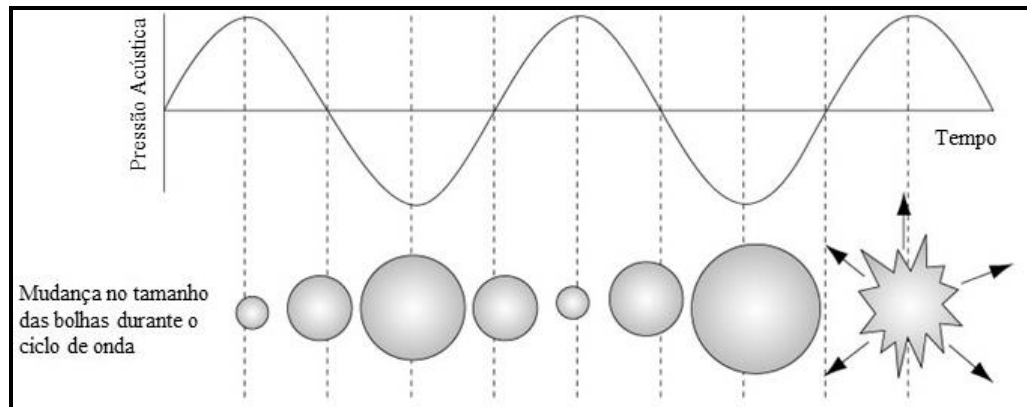


Figura 2.5. Representação dos ciclos de rarefação e compressão das bolhas com a passagem da onda acústica (Fonte: HAHN, 2006).

O processo de cavitação depende da intensidade do ultrassom, da temperatura e da pressão do meio, da viscosidade, da pressão de vapor do líquido e dos gases dissolvidos no meio líquido e também depende da frequência e da amplitude da onda acústica que se propaga (LEITE, 2015; KRUG, 2010). Esse processo provoca fenômenos físicos, como a erosão mecânica de sólidos, incluindo a ruptura das partículas através do rompimento de ligações, as quais adquirem menores dimensões. Este rompimento de ligações favorece a formação de radicais livres ($\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{O}_2\text{H}$, H_2O_2 , entre outros) no meio líquido, os quais são capazes de oxidar os compostos orgânicos presentes na matriz a ser analisada. Além disso, essa ruptura das partículas provenientes do processo de implosão das bolhas favorece o transporte e a penetração do solvente na amostra, pois aumenta a superfície com a redução do tamanho das partículas (LEITE, 2015; BENDICHO *et al.*, 2012; KRUG, 2010; SANTOS e CAPELO, 2007). A Figura 2.5 ilustra o colapso da superfície sólida até o momento da formação das novas partículas.

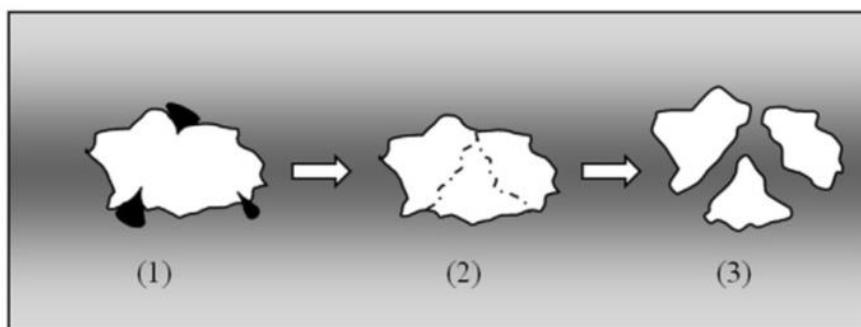


Figura 2.6. (1) Fenômeno de cavitação de gás sobre a superfície do sólido; (2) Divisão do sólido após a implosão das bolhas; (3) Novas partículas formadas com tamanho reduzido (Fonte: BENDICHO *et al.*, 2012).

Para obter uma boa eficiência no processo de digestão assistida por ultrassom, deve-se levar em consideração alguns fatores como o tamanho das partículas, o qual tem sido apresentado como o mais crítico entre os que influenciam os processos de digestão assistida por ultrassom (FILGUEIRAS, LAVILLA e BENDICHO, 2001); a massa da amostra, pois massas muito pequenas podem resultar na falta de homogeneidade e isso pode interferir nos resultados obtendo-se altos desvios padrão e, por outro lado, massas muito grandes podem gerar aglomeração do material, podendo afetar a solubilização da amostra e, conseqüentemente, a eficiência do processo (LEITE, 2015; DE LA CALLE *et al.*, 2009); o solvente a ser utilizado, sendo o meio ácido necessário para se obter uma boa recuperação do analito a ser analisado, pois em meio básico pode ocorrer a precipitação de alguns elementos na forma de hidróxidos insolúveis, além da concentração do solvente, como agente extrator, também ser um fator importante, pois em concentrações altas deste pode ocorrer a reabsorção dos analitos em vez da extração, resultando em extrações incompletas (LEITE, 2015; CAPELO, MADURO e VILHENA, 2005; MÉNDEZ *et al.*, 2002; FILGUEIRAS, LAVILLA e BENDICHO, 2001); o tempo de sonicação, visando garantir a máxima solubilização da amostra; a temperatura da água do banho ultrassônico; a frequência da energia ultrassônica; a posição do recipiente contendo a amostra dentro do banho, assim como, a quantidade de frascos e o volume de líquido, pois a intensidade ultrassônica no interior da cavidade do banho não é homogênea, podendo variar a distribuição da energia ultrassônica de acordo com esses fatores (BENDICHO *et al.*, 2012; SANTOS e CAPELO, 2007).

A digestão assistida por ultrassom, como método alternativo de preparo de amostra, apresenta algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais como baixo consumo de

energia, utilização de temperatura e pressão ambiente, uso de pequenos volumes de reagentes e de pequenas quantidades de massa da amostra, com a mínima geração de resíduos, além da diminuição dos riscos de contaminação e perdas dos analitos por volatilização (ROCHA *et al.*, 2013; BENDICHO *et al.*, 2012). Segundo Krug (2010), a extração/digestão ultrassônica apresenta potencialidades e surge como uma alternativa aos procedimentos convencionais utilizados no preparo de amostras para a espectrometria atômica (KRUG, 2010).

2.6. Validação dos Métodos Alternativos de Preparo de Amostra

O desenvolvimento de um novo método analítico, a adaptação ou a implementação de métodos já conhecidos envolve o processo de avaliação o qual permite garantir a eficiência do método para a sua aplicação na rotina do laboratório. Esse processo é denominado validação (BRITO *et al.*, 2003).

Segundo o INMETRO, a validação é definida como a comprovação, através do fornecimento de evidências objetivas, que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (BRASIL, 2007; BRASIL, 2000). O objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, deve-se garantir a partir da validação, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

A validação geralmente é realizada após a seleção, o desenvolvimento e a otimização dos métodos. Para o planejamento e a execução da validação sugere-se seguir uma sequência de trabalho, ou seja, definir a aplicação, o objetivo e o escopo do método; definir os parâmetros de desempenho e os critérios de aceitação; desenvolver um procedimento operacional para a validação; definir os experimentos de validação; verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; qualificar os materiais (por exemplo, padrões e reagentes) a serem utilizados; executar os experimentos preliminares de validação; ajustar os parâmetros do método ou os critérios de aceitação, se necessário; executar experimentos completos de validação; preparar um procedimento operacional para execução do método, para poder ser seguido na rotina; definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, etc.); e definir o tipo e a frequência de verificações de controle da qualidade analítica para a rotina (BRASIL, 2007; SILVA e ALVES, 2006; BRASIL, 2005a).

Para validar um método analítico deve-se avaliar alguns parâmetros de validação como seletividade, linearidade, intervalo de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

2.6.1. Seletividade

Segundo a ANVISA, seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto independente da presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). A seletividade está relacionada a um método utilizado para vários analitos com distinção entre eles (SILVA e ALVES, 2006).

A seletividade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos em amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou amostras não contaminadas, para comprovar que o resultado do teste não é afetado por esses contaminantes (SILVA e ALVES, 2006). Porém, a amostra pode conter contaminantes que interferem na medição e que não causam um sinal visível. Neste caso, podem ser aplicados os testes F de homogeneidade de variâncias e o teste t de comparação de médias. Obtendo-se $F_{calculado} < F_{crítico}$, demonstra que os contaminantes não interferem significativamente na precisão do método, porém se $F_{calculado} > F_{crítico}$, demonstra que os contaminantes interferem na precisão do método. O mesmo ocorre com o teste- t , se $t_{calculado} < t_{crítico}$, os contaminantes não interferem significativamente sobre o ensaio e se $t_{calculado} > t_{crítico}$, os contaminantes apresentam efeito estatisticamente significativo sobre o ensaio. O teste- t pode ser utilizado como fator decisivo caso o teste- F tenha sido maior que o $F_{crítico}$, porém o teste- t deve ser sempre calculado independentemente do resultado do teste- F (SILVA e ALVES, 2006).

2.6.2. Curva Analítica e Linearidade

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou a concentração do analito a ser quantificada muito raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa do analito de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas desse analito (RIBANI *et al.*, 2004; AUGUSTO, ANDRADE e CUSTODIO,

2000). Essa relação matemática geralmente é expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. É recomendado que a curva analítica seja construída com, no mínimo, cinco pontos e que não inclua o ponto zero na curva, devido a geração de possíveis erros (RIBANI *et al.*, 2004).

A quantificação do analito de interesse na validação de um método proposto pode ser obtida através dos métodos de padronização da curva analítica como a padronização externa, a padronização interna, a simulação de matriz e a adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

O método de padronização externa compara o sinal do analito a ser quantificado na matriz com as concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. A partir da equação da curva de calibração, é possível determinar a concentração do analito na amostra. Este método de calibração é sensível a erros relacionados ao preparo das amostras e dos padrões, e devido a isso se recomenda preparar os padrões de calibração a cada análise (RIBANI *et al.*, 2004; CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

O método de padronização por simulação de matriz se baseia na adição do padrão do analito de interesse em diversas concentrações em uma matriz similar a matriz da amostra a ser analisada, isenta do analito de interesse. Este método de calibração pode ser utilizado, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Este geralmente é usado para compensar os efeitos da matriz ou de possíveis interferentes e torna-se importante, principalmente, em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, na extração, na separação ou na detecção do analito de interesse. Em relação ao método de padronização externa apresenta vantagens uma vez que fornece uma melhor correspondência com a composição da matriz. Como desvantagens, este método de padronização aumenta o custo e o tempo das análises (RIBANI *et al.*, 2004; CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003; EGEEA-GONZÁLEZ *et al.*, 2002; CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

O método de padronização por adição de padrão se baseia na adição de quantidades conhecidas do analito de interesse que está sendo analisado a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. É construída uma curva analítica relacionando as quantidades do analito adicionado na amostra com os respectivos sinais analíticos obtidos. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde ao sinal do analito que está sendo determinado, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração do analito na amostra analisada (RIBANI *et al.*, 2004; BERG, MURTA e KUGLER, 1988). Trata-se de um método de padronização trabalhoso, mas importante quando

se tem uma amostra complexa, ou quando as interações com a matriz são significativas, ou ainda, quando houver dificuldades de se encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta do analito de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo a ANVISA, a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, ou seja, que a curva analítica seja construída com no mínimo cinco pontos. Se houver relação linear aparente após a análise visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados, geralmente através do método matemático conhecido como regressão linear, para a determinação dos coeficientes da curva analítica. Além dos coeficientes de regressão a e b (intercepto e inclinação), é possível calcular também, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r e o coeficiente de determinação R^2 . Estes dois coeficientes são utilizados para avaliação da linearidade, indicando o grau de ajuste dos dados a curva analítica e não devem ser empregados isoladamente (BRASIL, 2007; BRASIL, 2003; CARDOSO *et al.*, 2010). O coeficiente de correlação r permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 o valor deste, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor é a incerteza dos coeficientes estimados da regressão. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda que o coeficiente de correlação seja igual a 0,99 e o INMETRO recomenda que o valor seja maior que 0,90 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2007; RIBANI *et al.*, 2004). O coeficiente de determinação R^2 por sua vez, também conhecido como variação percentual explicada pelo modelo, é geralmente usado para avaliar o ajuste de um modelo e, conseqüentemente, a qualidade da regressão. O valor deste coeficiente pode variar entre $0 \leq R^2 \leq 1$, ou seja, quanto mais próximo de 1 mais o modelo consegue descrever a variação em y e maior será a qualidade da regressão (PIMENTEL e NETO, 1996). Ainda, pode-se avaliar a significância da regressão por meio de um teste- F apropriado, em que se obtendo a condição $F_{calculado} > F_{tabelado}$, indica existir uma relação linear entre as variáveis (a e b) e que a inclinação da reta não é nula, ou seja, demonstrando que a regressão é significativa (CARDOSO *et al.*, 2010). Além disso, para avaliar se o modelo é ou não adequado, ou se o ajuste do modelo pode ser considerado satisfatório, aplica-se um teste- F de falta de ajuste (F_{faj}), no qual obtendo-se a condição $F_{faj} < F_{critico}$, indica que o modelo

linear não apresenta falta de ajuste e pode ser considerado adequado (PIMENTEL e NETO, 1996).

2.6.3. Intervalo de Trabalho

O intervalo de trabalho do método analítico está relacionado a faixa da maior a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão, utilizando a linearidade do método (BRITO *et al.*, 2003).

2.6.4. Limite de Detecção (LD)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito é importante saber qual o menor valor de concentração desse analito que pode ser detectada pelo método que está sendo desenvolvido (BRASIL, 2007). Assim, o limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Este limite é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável ou utilizando-se os dados das curvas analíticas, ou seja, a partir da inclinação e dos desvios padrão do controle analítico (branco). A estimativa do limite de detecção, no caso da utilização de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica) geralmente é determinada pela Equação 2.30,

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad (\text{Equação 2.30})$$

em que S_B é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

2.6.5. Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação pode ser definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). É obtido por meio da análise de soluções

contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis ou utilizando-se os dados das curvas analíticas, ou seja, a partir da inclinação e dos desvios padrão do controle analítico (branco). Geralmente é expresso a partir da Equação 2.31,

$$LQ = \frac{1.65 S_B}{b} \quad (\text{Equação 2.31})$$

em que S_B é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

2.6.6. Precisão

A precisão pode ser definida como um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões nas condições definidas (BRASIL, 2007). Pode ser expressa em três níveis:

- *Repetitividade*: concordância entre os resultados dentro de um período de tempo curto, sendo realizada com o mesmo analista e com a mesma instrumentação.
- *Precisão Intermediária*: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
- *Reprodutibilidade*: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização da metodologia analítica.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas conforme mostra a Equação 2.32.

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{S}{x} \times 100 \quad (\text{Equação 2.32})$$

em que S é o desvio padrão e x é a média global das medidas realizadas no mesmo dia. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a

concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

2.6.7. Exatidão

A exatidão do método pode ser definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Geralmente os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: o uso de materiais de referência, a comparação de métodos e a realização de ensaios de recuperação. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, a exatidão pode resultar numa combinação de erros aleatórios e sistemáticos (BRASIL, 2007).

Sempre que estiverem disponíveis os materiais de referência certificados para a matriz que está sendo analisada, estes devem ser utilizados no processo de validação. O uso correto dos materiais de referência certificados consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Caso o valor obtido não estiver dentro do intervalo da região de aceitação para o valor certificado, o laboratório deve tentar encontrar as causas desse desvio e procurar eliminá-las (BRASIL, 2007). E, caso os materiais de referência certificados não estejam disponíveis para a matriz desejada, pode-se recorrer à comparação de métodos e a ensaios de recuperação para avaliar a exatidão do método proposto.

A comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método proposto e a partir de um método adotado como referência, avaliando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, a exatidão do método proposto em relação ao método adotado como referência. As análises são realizadas utilizando-se os dois métodos separadamente (o método proposto e o método adotado como referência), sobre as mesmas amostras, em uma faixa de concentração que se pretende validar o método (RIBANI *et al.*, 2004). Já a recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo analito. As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, como por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na matriz. A presença de analitos adicionados em uma forma

mais facilmente detectável pode levar a altas taxas de recuperação (BRASIL, 2007). A recuperação geralmente é calculada a partir da Equação 2.33,

$$Rec. \% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (\text{Equação 2.33})$$

em que C_1 está relacionado a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 a concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 a concentração do analito adicionada na amostra (NATA, 2012; BRASIL, 2007).

2.6.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em manter inalterado a pequenas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003). Os testes utilizados para avaliar a robustez indicam os fatores que podem influenciar significativamente na resposta do método analítico. Um dos testes utilizados para avaliar a robustez de um método analítico é o teste de Younden. Este teste além de avaliar a robustez do método, ele indica também, qual o tipo de influência de cada uma das variações nos resultados finais (SILVA e ALVES, 2006; BRITO *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 3. METODOLOGIA

CAPÍTULO 3. METODOLOGIA

3.1. Amostragem

Para a aplicação das metodologias de preparo de amostra alternativas (reação Fenton, reação de Foto-Oxidação UV e digestão ácida assistida por ultrassom) otimizadas e validadas foram adquiridas 10 amostras comerciais de açúcar mascavo (Figura 3.1) de diferentes fabricantes e lotes na cidade de Guarapuava – PR. Essas amostras permaneceram armazenadas em suas embalagens de origem, sendo apenas mantidas bem fechadas para evitar qualquer contaminação e foram identificadas por um número de acordo com sua ordem de entrada no laboratório e por uma letra de acordo com o fabricante. Esta e outras informações relevantes são apresentadas na Tabela 3.1.

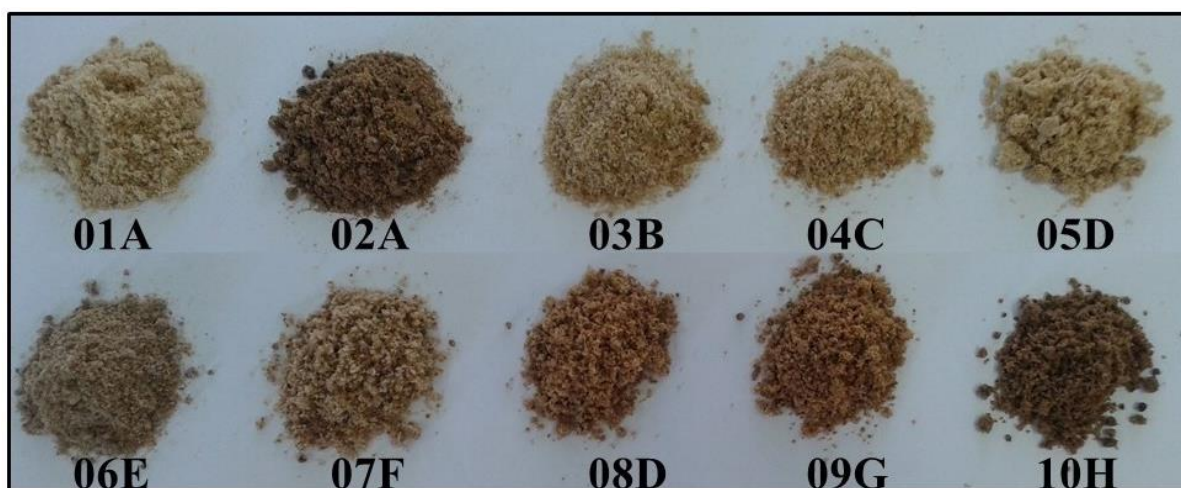


Figura 3.1. Amostras de açúcar mascavo de diferentes fabricantes e lotes (Fonte: Arquivo pessoal).

Tabela 3.1. Informações relevantes das amostras de açúcar mascavo.

ID¹	Fabricante²	Procedência³	Lote	Tipo de Processo⁴	Coloração⁵
<i>01</i>	A	Paranacity / PR	-	Artesanal	Clara
<i>02</i>	A	Paranacity / PR	-	Artesanal	Escura
<i>03</i>	B	Santo Antônio da Patrulha / RS	-	Artesanal	Clara
<i>04</i>	C	Santo Antônio da Patrulha / RS	009	Artesanal	Clara
<i>05</i>	D	Salto do Lontra / PR	03	Industrial	Clara
<i>06</i>	E	Curitiba / PR	912	Industrial	Clara
<i>07</i>	F	Curitiba / PR	120719	Industrial	Clara
<i>08</i>	D	Salto do Lontra / PR	06	Industrial	Clara
<i>09</i>	G	Terra Boa / PR	08	Artesanal	Clara
<i>10</i>	H	Terra Boa / PR	03	Industrial	Escura

ID¹ = Identificação das amostras de açúcar mascavo; ² Identificação dos fabricantes por letras; ³ Local de fabricação das amostras; ⁴ Tipo do processo utilizado na fabricação; ⁵ Coloração característica de cada amostra determinada por observação visual.

Para a otimização da reação Fenton e da reação de Foto-Oxidação UV foram utilizadas a amostra 10H e para a otimização da Digestão Ácida Assistida por Ultrassom foram utilizadas as amostras 07F e 10H.

3.2. Reagentes e Equipamentos

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida através do sistema TKA-GenPure (Thermo Scientific, Alemanha). As soluções de Mn, Zn, Mg e Fe foram preparadas diariamente a partir de diluições de soluções padrão de 1000 mg L⁻¹ (SpecSol). Ácido nítrico (HNO₃) 65% (v/v) (FMaia), ácido clorídrico (HCl) 36% (v/v) (FMaia), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% (m/v) (Biotec), acetato de sódio (C₂H₃NaO₂) (Biotec) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) (Biotec) também foram utilizados.

Para a otimização do preparo de amostra pela reação de Foto-Oxidação UV foram utilizadas cubetas de vidro com caminho ótico de 10 mm. Os espectros de varredura entre 400 e 700 nm foram obtidos em um espectrofotômetro de feixe duplo da Varian, modelo UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Bio localizado no Laboratório de Multiusuários e os ensaios do planejamento fatorial foram realizados em um espectrofotômetro de feixe simples Spectrum Meter, modelo SP-2000 UV, localizado no Laboratório do Grupo de Análise de

Traços e Instrumentação (LabGati), ambos da Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro, Campus Cedeteg.

Para o preparo das soluções das amostras de açúcar mascavo pelos diferentes métodos de preparo de amostra (reação Fenton, reação de Foto-Oxidação UV, digestão ácida assistida por ultrassom, digestão por via seca e digestão por via úmida) foram utilizados equipamentos como banho ultra-sônico (Unique), sem aquecimento, com capacidade de 9,0 L e frequência de 40 kHz), mufla (Quimis), chapa de aquecimento (Novatecnica), centrífuga para tubos (Quimis), balança analítica (Shimadzu, modelo AUW220D) com precisão de $\pm 0,0001$ g e sistemas de micropipetas (Labmate-HTL) com diferentes capacidades. Para o preparo das soluções de açúcar mascavo usando a reação de Foto-Oxidação UV foi utilizado um digestor UV de laboratório (Figura 3.2) equipado com uma lâmpada de vapor de mercúrio (250 W).



Figura 3.2. Digestor UV utilizado para o preparo das soluções de açúcar mascavo usando a reação de Foto-Oxidação UV (Fonte: Arquivo pessoal).

3.3. Técnicas Limpas

Procedimentos de técnicas limpas foram adotados para minimizar possíveis processos de contaminação ou adulterações das soluções padrão e das amostras. As vidrarias utilizadas nos experimentos foram previamente lavadas com água corrente e detergente comercial. Em seguida, foram enxaguadas com água corrente e, após, com água ultrapura. Então, foram

descontaminadas em banho de HNO_3 5% (v/v) por um período mínimo de 12 h. Passado esse tempo, as vidrarias foram retiradas do banho e enxaguadas com água ultrapura (DOS ANJOS, ABATE e GRASSI, 2010; CAMPOS, BENDO e VIEL, 2002). Água ultrapura foi utilizada também para o preparo das soluções padrão e das soluções das amostras.

Durante todo o processo de limpeza e de ensaios, os materiais foram manipulados em bandejas previamente descontaminadas e em bancadas previamente limpas com álcool em gel. Nestas etapas, os materiais e as amostras de açúcar mascavo foram manuseados com o auxílio de luvas de procedimento, para evitar possíveis contaminações com metais.

3.4. Espectrofotometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS)

As determinações dos metais Mn, Zn, Mg e Fe foram realizadas utilizando-se um Espectrofotômetro de Absorção Atômica em Chama (FAAS) (Varian, modelo AA 220) (Figura 3.3) localizado no Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação (LabGati) da Unicentro no Campus Cedeteg.



Figura 3.3. Espectrofotômetro de absorção atômica em chama (Fonte: Arquivo pessoal).

Para a atomização foi utilizada uma chama composta de ar/acetileno. Lâmpadas de cátodo oco da Varian e da Agilent foram utilizadas para cada elemento analisado empregando-se as condições operacionais recomendadas pelo fabricante do equipamento (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Parâmetros operacionais empregados na determinação de Mn, Zn, Mg e Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

Parâmetros	Mn	Zn	Mg	Fe
<i>Comprimento de onda (nm)</i>	232,0	213,9	285,2	248,3
<i>Corrente de lâmpada (mA)</i>	10	5	4	5
<i>Largura da fenda (nm)</i>	0,2	1,0	0,5	0,2
<i>Fluxo de acetileno (L min⁻¹)</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Fluxo de ar (L min⁻¹)</i>	3,5	3,5	3,5	3,5

3.5. Preparo das Soluções de Açúcar Mascavo

3.5.1. Digestão por Via Seca

A digestão por via seca, adotada neste trabalho como método de referência foi realizada seguindo o fluxograma representado na Figura 3.4.

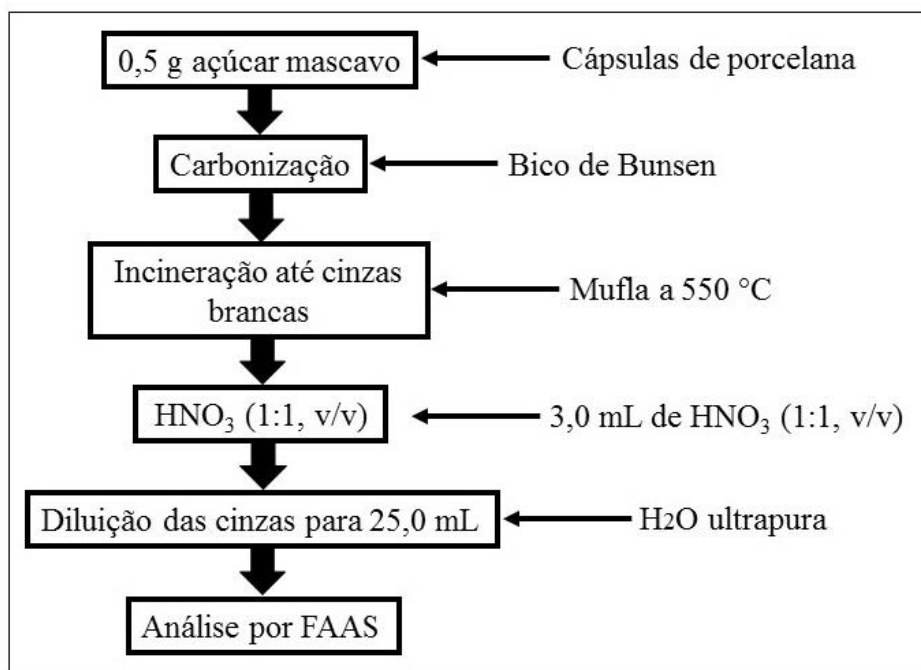


Figura 3.4. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo pela digestão por via seca.

As soluções de açúcar mascavo foram preparadas a partir da diluição das cinzas de cada amostra. Nesta etapa, de obtenção das cinzas, foi utilizado o método de preparo da amostra de digestão por via seca 394/IV descrito nos Métodos Físico-Químicos para Análise

de Alimentos (IAL, 2008). As amostras de açúcar mascavo foram pesadas em cápsulas de porcelana e carbonizadas em bico de Bünsen até que não houvesse mais desprendimento de fumaça e em seguida foram levadas para incineração em forno mufla até a obtenção de cinzas brancas, ou seja, por um período de aproximadamente quatro horas na temperatura de 550 °C. Após resfriadas, as cinzas foram solubilizadas em solução de HNO₃ 1:1 (v/v), sendo que em cada amostra de cinzas foram adicionados 3,0 mL da solução ácida e o volume foi completado com água ultrapura para 25,0 mL. O mesmo procedimento foi adotado para a preparação de um branco analítico, em que apenas não foi adicionada a amostra de açúcar mascavo. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

3.5.2. Digestão por Via Úmida

As soluções de açúcar mascavo usando a digestão por via úmida, também adotada neste trabalho como método de referência, foram preparadas seguindo o fluxograma representado na Figura 3.5.

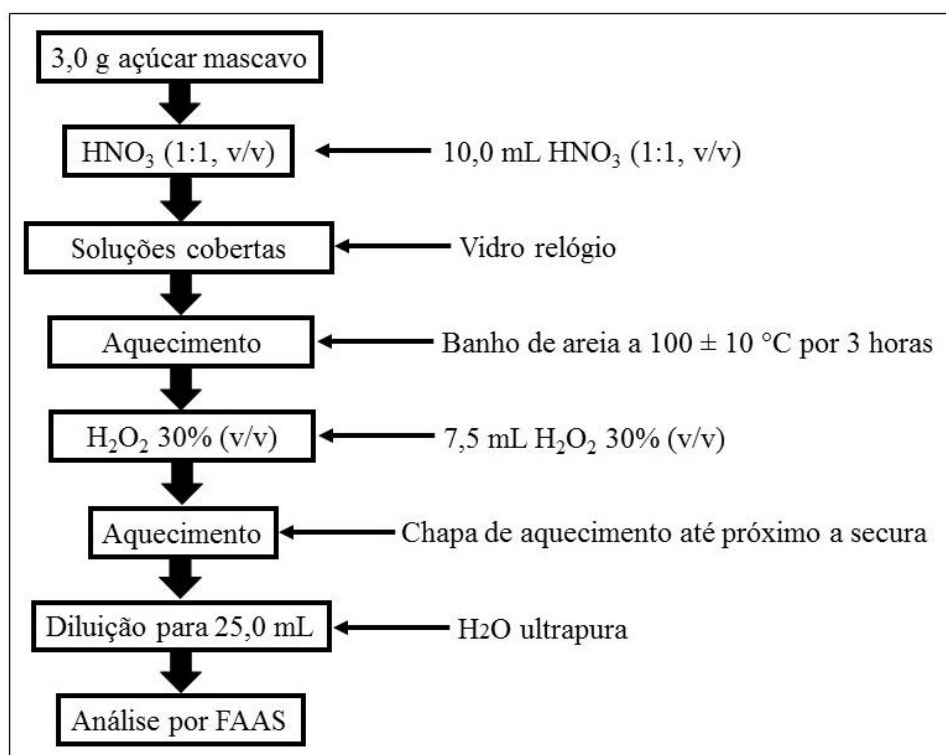


Figura 3.5. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo pela digestão por via úmida.

As soluções de açúcar mascavo usando a digestão por via úmida foram preparadas de acordo com o método proposto por Pohl, Sergiel e Prusisz (2011), com modificações na massa da amostra. Após a pesagem da amostra em béquer de 100 mL foram adicionados 10,0 mL de HNO_3 (1:1, v/v) e em seguida, a solução foi coberta com vidro de relógio e deixada em aquecimento em banho de areia a 100 ± 10 °C durante 3 horas. Posteriormente, foram adicionados 7,5 mL de H_2O_2 (30%, v/v) e a solução foi aquecida sob as mesmas condições até próximo da secura. Por fim, a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25,0 mL e diluída com água ultrapura. O mesmo procedimento foi adotado para a preparação de um branco analítico, em que apenas não foi adicionada a amostra de açúcar mascavo. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

3.5.3. Reação Fenton

As soluções de açúcar mascavo, utilizadas na análise de Mn por FAAS usando a reação Fenton foram preparadas de acordo com o fluxograma representado na Figura 3.6.

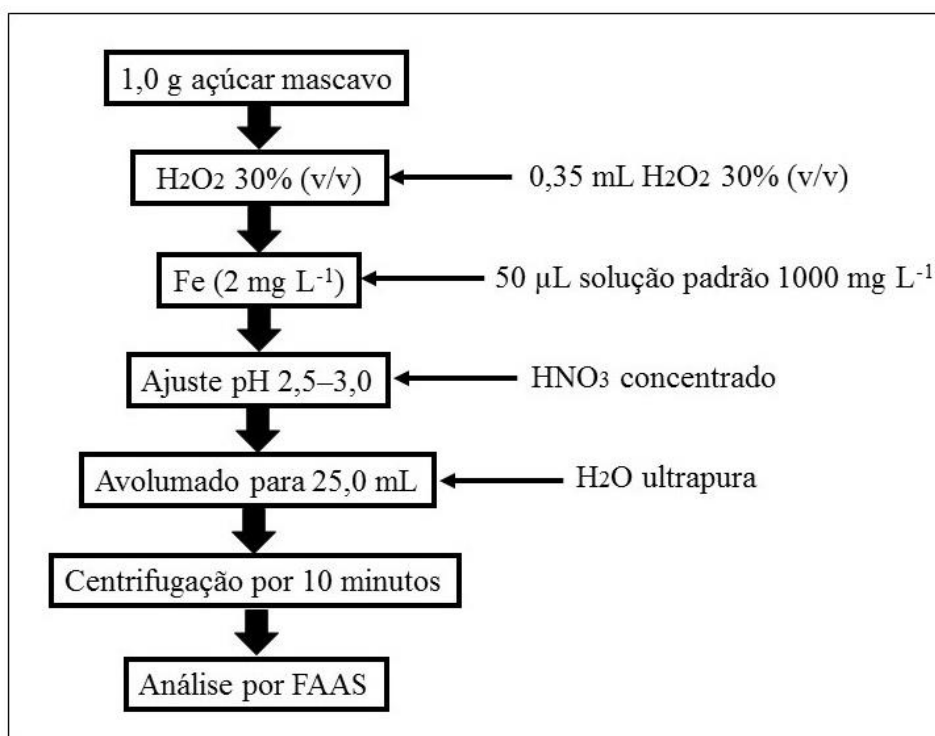


Figura 3.6. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo pela reação Fenton utilizada na análise de Mn por FAAS.

Para a reação Fenton as soluções de açúcar mascavo foram preparadas a partir de 1,0 g de amostra de açúcar mascavo. Após a pesagem em béquer de 100 mL foram adicionados 10,0 mL de H₂O ultrapura para facilitar a solubilização do açúcar, 0,35 mL de H₂O₂ 30% (v/v) e 50 µL de solução padrão de Fe de 1000 mg L⁻¹. Então foi realizado o ajuste do pH para o intervalo de 2,5 a 3,0 com HNO₃ 65% (v/v). A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL e foi completado o volume com H₂O ultrapura. Então a solução foi transferida para um tubo de centrífuga do tipo Falcon de 50 mL e realizada a centrifugação por 10 minutos com a finalidade de separar as partículas sólidas, que ainda estavam presentes na solução. Em seguida foi realizada a análise do sobrenadante por FAAS. O mesmo procedimento foi adotado para a preparação de um branco analítico, em que apenas não foi adicionada a amostra de açúcar mascavo. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

3.5.4. Reação de Foto-Oxidação UV

Para a reação de Foto-Oxidação UV utilizada na análise de Zn e Mg as soluções de açúcar mascavo foram preparadas de acordo com o fluxograma representado na Figura 3.7.

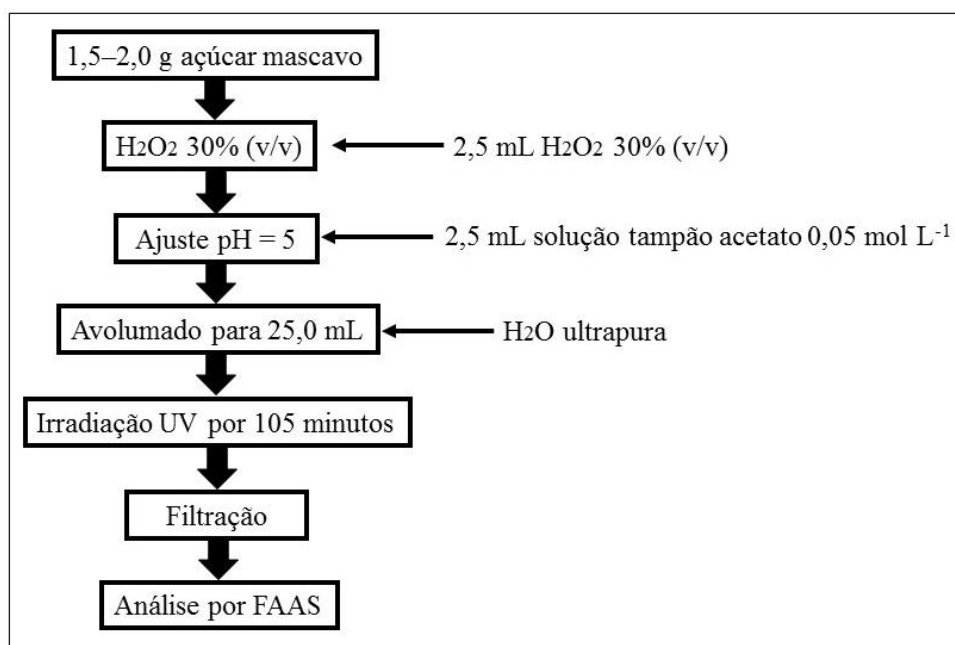


Figura 3.7. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo usando a reação de Foto-Oxidação UV para a análise de Zn e Mg.

Para a reação de Foto-Oxidação UV as soluções de açúcar mascavo foram preparadas a partir da pesagem de 1,5 a 2,0 g de amostra em béquer de 100 mL, com a adição de 5,0 mL de água ultrapura para facilitar a solubilização do açúcar, seguida da adição de 2,5 mL de H_2O_2 30% (v/v) e 2,5 mL de solução tampão de acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ para o ajuste do pH 5,0. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL e completado o volume com água ultrapura e em seguida foi transferida para uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro. Posteriormente, a placa de Petri contendo a solução de açúcar mascavo foi levada para o digestor UV e permaneceu em irradiação UV por 105 minutos. A Figura 3.8 ilustra como foram organizadas as placas de Petri no digestor UV.

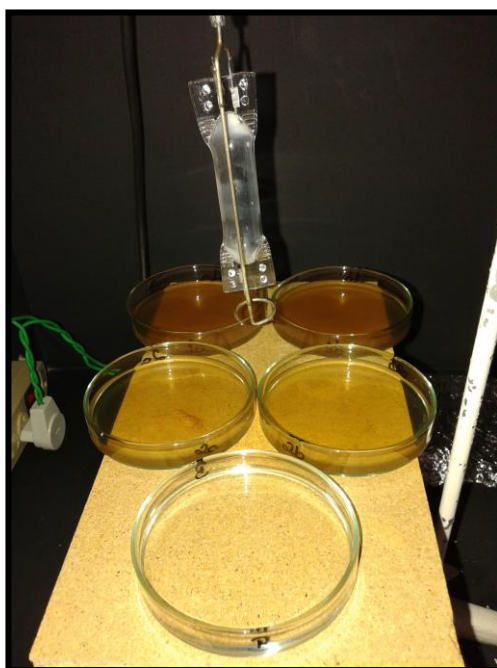


Figura 3.8. Placas de Petri com as soluções de açúcar mascavo no digestor UV.

Após a irradiação UV foi realizada uma filtração simples com a finalidade de retirar as possíveis partículas sólidas e sujidades que ainda poderiam estar presentes na solução. A Figura 3.9 ilustra duas das amostras de açúcar mascavo analisadas (05D e 09G) antes e após a irradiação UV.

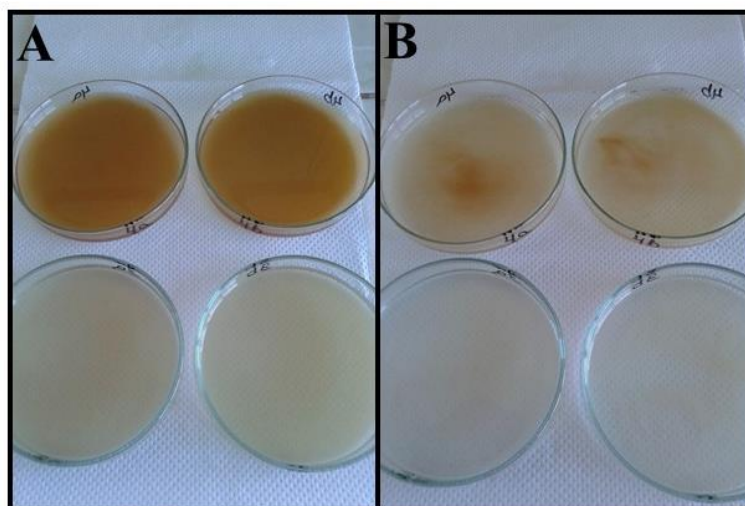


Figura 3.9. A) Solução de açúcar mascavo (amostra 09G) e B) solução de açúcar mascavo (amostra 05D) antes e depois da irradiação UV.

Em seguida foi realizada a análise do sobrenadante por FAAS. O mesmo procedimento foi adotado para a preparação de um branco analítico, em que apenas não foi adicionada a amostra de açúcar mascavo. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

3.5.5. Digestão Ácida Assistida por Ultrassom

Para a digestão ácida assistida por ultrassom adotada na análise de Fe, as soluções de açúcar mascavo foram preparadas de acordo com o fluxograma representado na Figura 3.10.

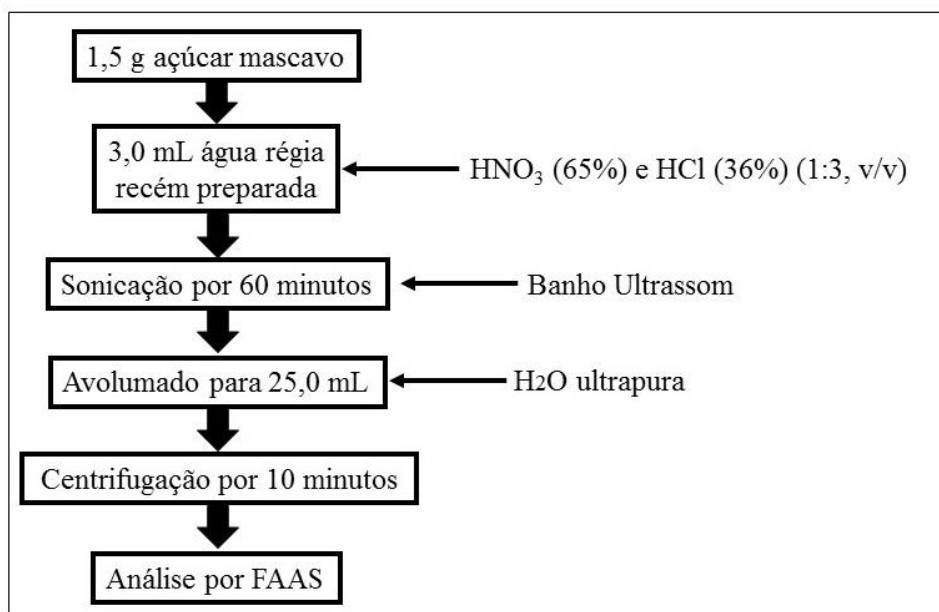


Figura 3.10. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado no preparo das soluções de açúcar mascavo utilizadas na análise de Fe pelo processo de digestão ácida assistida por ultrassom.

As soluções de açúcar mascavo utilizando a digestão ácida assistida por ultrassom foram preparadas a partir da pesagem em papel manteiga de 1,5 a 2,0 g de amostra. Em seguida essa massa de amostra foi transferida para um tubo de centrifuga do tipo Falcon de 15,0 mL e adicionou-se 3,0 mL de solução de água régia (1:3, v/v) recém-preparada. Em seguida, a mistura foi sonicada em banho ultrassom por 60 minutos a temperatura ambiente (Figura 3.11). Posteriormente, a solução resultante foi diluída para 25,0 mL com água ultrapura e centrifugada por 10 minutos, com a finalidade de separar as partículas sólidas, que ainda poderiam estar presentes na solução. Em seguida foi realizada a análise do sobrenadante por FAAS. O mesmo procedimento foi adotado para a preparação de um branco analítico, em que apenas não foi adicionada a amostra de açúcar mascavo. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

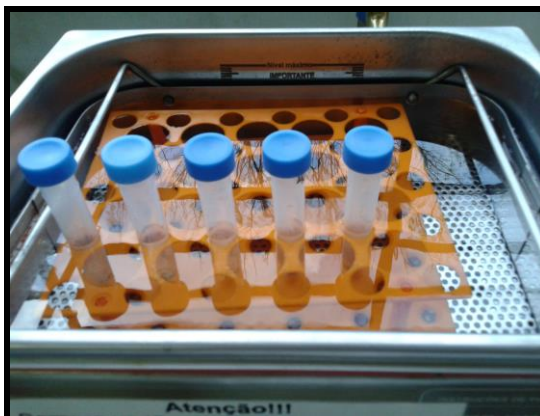


Figura 3.11. Soluções de açúcar mascavo dispostas no banho ultrassom durante a digestão ácida assistida por ultrassom.

3.6. Otimização dos Métodos Analíticos Alternativos de Preparo de Amostra

3.6.1. Otimização da Reação Fenton por Planejamento Fatorial

A otimização da reação Fenton, como preparo de amostra alternativo para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS, foi realizada pela aplicação de um planejamento fatorial 2^2 . Esse planejamento foi adotado para avaliar a influência das condições de análise da reação Fenton na degradação da matéria orgânica para então posteriormente selecionar a condição ótima para a determinação do teor de Mn em açúcar mascavo, uma vez que a análise de metais por FAAS depende do grau de mineralização da matéria orgânica da amostra. Os fatores avaliados no planejamento fatorial foram: a concentração de H_2O_2 (% m/v) e de Fe ($mg L^{-1}$). Na Tabela 3.3 são apresentados os fatores e os níveis avaliados no planejamento fatorial.

Tabela 3.3. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 aplicado a reação Fenton*.

Ensaio	Fatores	
	Concentração de H_2O_2 (%, m/v)	Concentração de Fe ($mg L^{-1}$)
1	(-) 0,5	(-) 2,0
2	(+) 9,0	(-) 2,0
3	(-) 0,5	(+) 150
4	(+) 9,0	(+) 150

*Para todos os ensaios foi adotada a amostra de açúcar mascavo 10H.

Os efeitos dos fatores do planejamento fatorial foram calculados de acordo com a equação 3.1.

$$Ef = (R+) - (R-) \quad (\text{Equação 3.1})$$

em que R+ e R- são as diferenças das médias dos níveis (+) e (-), respectivamente, dos fatores envolvidos.

Os efeitos das variáveis do planejamento fatorial foram testados para significância estatística no nível de 95% de confiança pelo cálculo do erro padrão e pela análise do gráfico de Pareto. A análise estatística dos dados foi realizada empregando-se o software estatístico *Minitab* for Windows v. 16.2.2 (MINITAB, 2010).

3.6.2. Otimização da Reação de Foto-Oxidação UV por Planejamento Fatorial

A otimização da preparação da amostra pela reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg por FAAS, foi realizada pela aplicação de um planejamento fatorial 2^4 . Esse planejamento foi adotado para avaliar a influência das condições de análise dessa reação na degradação da matéria orgânica para então posteriormente selecionar a condição ótima para a determinação dos teores de Zn e Mg em açúcar mascavo.

Os fatores avaliados no planejamento fatorial foram: o volume de H_2O_2 30% (m/v) em mL, o pH da solução, a concentração da solução tampão em mol L^{-1} e o tempo de irradiação UV em minutos, utilizando-se como resposta a absorbância das soluções de açúcar mascavo a 400 nm. Na Tabela 3.4 são apresentados os fatores e os níveis adotados para a otimização do preparo de amostra usando a reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg por FAAS. Para o ajuste do pH 5,0 para metade dos ensaios do planejamento fatorial foram utilizadas soluções tampão de acetato (0,05 e 0,25 mol L^{-1}) e para o ajuste do pH 10,0 foram empregadas soluções tampão de carbonato (0,05 e 0,25 mol L^{-1}), ambas preparadas de acordo com Filgueiras, Lavilla e Bendicho (2001).

Tabela 3.4. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^4 aplicado a reação de Foto-Oxidação UV*.

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
<i>Volume de H₂O₂ 30% (m/v) (mL)</i>	0,5	2,5
<i>pH</i>	5	10
<i>Concentração da Solução Tampão (mol L⁻¹)</i>	0,05	0,25
<i>Tempo de Irradiação UV (min)</i>	20	90

*Para todos os ensaios foi adotada a amostra de açúcar mascavo número 10H.

Os efeitos dos fatores do planejamento fatorial foram calculados de acordo com a equação 3.1 do item 3.6.1.

Os efeitos das variáveis na absorbância da solução de açúcar mascavo a 400 nm foram testados para a significância estatística no nível de 95% de confiança pelo cálculo do erro padrão e pela análise do gráfico de Pareto. A análise estatística dos dados foi realizada empregando-se o software estatístico *Minitab* for Windows v. 16.2.2 (MINITAB, 2010).

3.6.3. Otimização Univariada da Digestão Ácida Assistida por Ultrassom

Para a otimização do preparo de amostra a partir da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe por FAAS foram utilizados ensaios univariados em que foram avaliados a massa da amostra e o volume de água régia. Na Tabela 3.5, são apresentadas as condições adotadas para a otimização deste método alternativo de preparo de amostra.

Tabela 3.5. Condições utilizadas para a otimização univariada da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS.

Condições	Amostra	Massa (g)	Volume de Água Régia (mL)	Tempo de sonicação (minutos)	Volume Final (mL)
<i>1</i>	10H	0,5	2,0	60	25
	07F	0,5	2,0	60	25
<i>2</i>	10H	1,5	3,0	60	25
	07F	1,5	3,0	60	25

Nas condições 1 e 2 da digestão ácida assistida por ultrassom, foram avaliadas de forma univariada a massa de amostra (0,5 e 1,5 g) e o volume de água régia (2,0 e 3,0 mL),

mantendo-se constante o tempo de sonicação (60 minutos) e o volume final de solução (25,0 mL).

Para verificar se haviam diferenças significativas na concentração de Fe entre as condições avaliadas em relação aos resultados da digestão por via seca foi aplicado um teste-*t* no nível de 95% de confiança.

3.7. Validação dos Métodos de Preparo de Amostra Alternativos

A validação dos métodos de preparo de amostra para a análise de açúcar mascavo por FAAS que fazem uso da reação Fenton para a determinação de Mn, da reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg e da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe foi realizada seguindo-se as recomendações de guias da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e de artigos da literatura. O estudo de validação dos três métodos alternativos de preparo de amostra compreendeu a análise dos parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no nível de 95% de confiança, utilizando o software estatístico *Minitab* for Windows versão 16.2.2 (MINITAB, 2010).

3.7.1. Curvas Analíticas e Linearidade

As curvas analíticas dos métodos de preparo de amostra propostos (reação Fenton, reação de Foto-Oxidação UV e digestão ácida assistida por ultrassom) foram construídas por dois métodos de padronização. O primeiro método adotado foi o de padronização externa (PE), que consistiu na dissolução dos padrões de Mn, Zn, Mg e Fe em água ultrapura e o segundo método de padronização foi o de simulação de matriz (SM), que consistiu na dissolução dos padrões em solução de sacarose 10% (m/v). A calibração por simulação de matriz foi realizada para avaliar se haviam interferências da matriz de açúcar mascavo nas determinações dos metais propostos por FAAS (POHL e SERGIEL, 2009; ANDRADE *et al.*, 2014). As curvas de calibração foram construídas dentro da faixa linear de cada elemento, Mn (0,3 a 1,5 mg L⁻¹), Zn (0,1 a 1,2 mg L⁻¹), Mg (0,2 a 0,8 mg L⁻¹) e Fe (1,0 a 5,0 mg L⁻¹), sendo

cada ponto da curva analítica analisado em duplicata. A linearidade das curvas analíticas foi verificada por regressão linear simples e por um teste de falta de ajuste, ambos no nível de 95% de confiança.

3.7.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Os valores de LD e de LQ dos métodos de preparo de amostra propostos (reação Fenton, reação de Foto-Oxidação UV e digestão ácida assistida por ultrassom) foram obtidos utilizando-se os dados das equações das curvas analíticas de padrão externo de cada um dos metais analisados (ARAÚJO, 2009). A determinação dos respectivos limites foi realizada a partir do desvio padrão (S_B) de 10 medidas consecutivas do controle analítico (branco) e da inclinação (coeficiente angular da curva analítica de cada metal) de acordo com as equações 2.30 do item 2.6.4 e 2.31 do item 2.6.5 (BRASIL, 2003a). O controle analítico consistiu em uma solução preparada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.5 para cada um dos metais propostos, sem a adição da amostra de açúcar mascavo.

3.7.3. Precisão

A precisão dos métodos de preparo de amostra propostos foi avaliada pela aplicação de um teste- F de comparação das variâncias ponderadas dos resultados obtidos pela aplicação dos métodos alternativos (reação Fenton, reação de Foto-Oxidação UV e da digestão ácida assistida por ultrassom) com as variâncias ponderadas dos resultados obtidos pelos métodos adotados como referência (digestão por via seca e digestão por via úmida). A reação Fenton foi comparada com os dois métodos adotados como referência (digestão por via seca e digestão por via úmida) e a reação de Foto-Oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom foram comparadas somente com a digestão por via seca. A precisão da reação Fenton também foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD%) obtido em condições de repetitividade. Para a obtenção das estimativas de repetitividade foram preparadas cinco réplicas verdadeiras usando o procedimento descrito no item 3.5.3 deste capítulo para a amostra de açúcar mascavo número 06E e os dados gerados foram utilizados no cálculo do RSD (%), também conhecido como coeficiente de variação (CV), de acordo com a equação 2.32 do item 2.6.6.

3.7.4. Exatidão

Geralmente, os processos mais utilizados para se avaliar a exatidão de um método são: o uso de materiais de referência certificados, a comparação de métodos e os ensaios de recuperação por adição de padrão (ARAÚJO, 2009; BRASIL, 2007). Como materiais de referência certificados não estão disponíveis para o açúcar mascavo, para avaliar a exatidão dos métodos alternativos de preparo de amostra (reação Fenton, reação de Foto-Oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom) em relação aos métodos adotados como referência foi realizada uma comparação entre os resultados destes com os determinados pela digestão por via seca e pela digestão por via úmida, para as dez amostras de açúcar mascavo pela aplicação de um teste-*t* pareado e pela aplicação da técnica de regressão linear, ambos no nível de 95% de confiança. A técnica de regressão linear foi escolhida por permitir a identificação de possíveis erros sistemáticos nos métodos comparados (MILLER e MILLER, 2005).

Novamente, a reação Fenton foi comparada com os dois métodos adotados como referência (digestão por via seca e digestão por via úmida) e a reação de Foto-oxidação UV e a digestão ácida assistida por ultrassom foram comparadas somente com a digestão por via seca. A exatidão da reação Fenton também foi avaliada por ensaios de recuperação por adição de padrão em dois níveis de concentração, em que foram preparadas suspensões aquosas de açúcar mascavo (amostra 06E) de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.3 deste capítulo para a reação Fenton e as soluções foram fortificadas em dois níveis conhecidos de Mn (0,3 e 0,6 mg L⁻¹). As porcentagens de recuperação (%) foram calculadas de acordo com a equação 2.33 do item 2.6.7.

**CAPÍTULO 4. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS
ALTERNATIVOS DE PREPARO DE AMOSTRA**

CAPÍTULO 4. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS DE PREPARO DE AMOSTRA

4.1. Aplicação da Reação Fenton para a Determinação de Mn por FAAS

4.1.1. Otimização da Reação Fenton

Apesar das inúmeras vantagens dos processos oxidativos avançados no tratamento de amostras com elevado teor de carbono, ainda são escassas as aplicações destes a análise elementar de alimentos por espectrometria atômica (GROMBONI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2012). Gromboni *et al.* (2010) aplicou a reação de Foto-Fenton como preparo de amostra alternativo para a determinação dos metais Ba, C, Ca, K, Mg, Mn, Na e Sr em amostras de sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Os autores reportaram como condição ótima de análise para o uso da reação Foto-Fenton uma concentração de Fe de 150 mg L⁻¹ (0,75 mL de solução padrão de 1000 mg L⁻¹) e de H₂O₂ de 9,0 % (m/v) (1,5 mL de solução 30% (m/v)) para um volume final de 10,0 mL. No presente trabalho, com o intuito de minimizar a concentração de reagentes utilizados na reação Fenton aplicada a análise de Mn em açúcar mascavo por FAAS, foram avaliadas concentrações menores de Fe (2,0 mg L⁻¹) e de H₂O₂ (0,5 %, m/v) para um volume final de 25,0 mL. Essa redução na concentração dos reagentes foi realizada considerando-se as diferenças instrumentais entre as técnicas de ICP-OES e FAAS, em que a última não exige a completa mineralização da amostra antes da análise dos metais e as diferenças de composição dos alimentos investigados. Desta forma, para definir quais seriam as melhores condições para a otimização da reação Fenton, como preparo de amostra alternativo, foi aplicado um planejamento fatorial 2² em que foi avaliada a influência da concentração dos reagentes H₂O₂ e de Fe (Tabela 4.1) na eficiência da degradação da matéria orgânica. Os resultados do planejamento fatorial e os efeitos calculados são apresentados na Tabela 4.2.

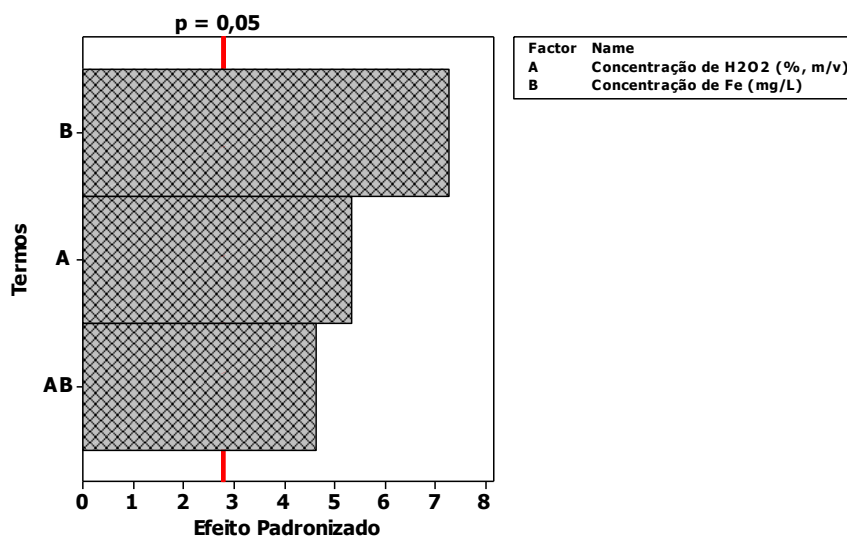
Tabela 4.1. Matriz do planejamento fatorial 2^2 para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS.

Ensaio	Fatores		Teor de Mn (mg g ⁻¹)		
	Concentração de H ₂ O ₂ (%, m/v)	Concentração de Fe (mg L ⁻¹)	Reação Fenton	Digestão por Via Seca	Digestão por Via Úmida
1	(-) 0,5	(-) 2,0	4,968 ± 0,079		
2	(+) 9,0	(-) 2,0	4,195 ± 0,120	4,434 ± 0,078	5,012 ± 0,023
3	(-) 0,5	(+) 150	4,017 ± 0,101		
4	(+) 9,0	(+) 150	3,990 ± 0,028		

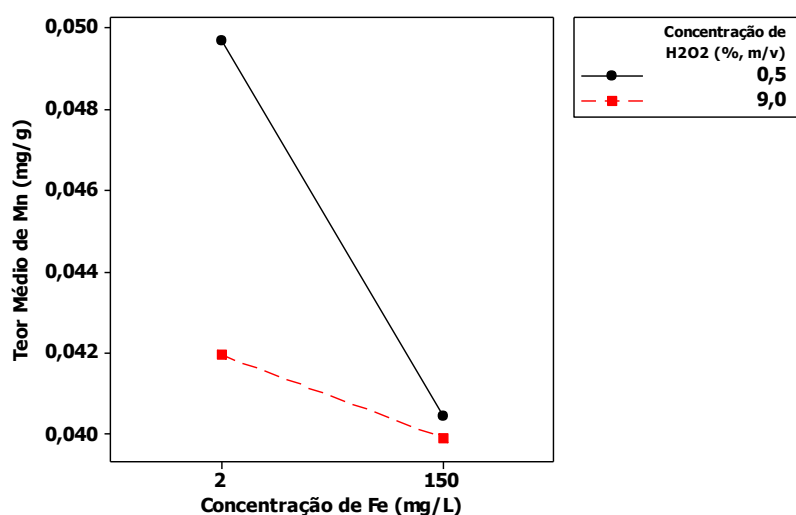
Tabela 4.2. Efeitos médios calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial 2^2 para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS.

Efeitos	Estimativas ± Erro Padrão
Média Global	0,430 ± 0,039
Efeitos Principais	
Concentração de H ₂ O ₂ (%, m/v) (1)	-0,414 ± 0,078
Concentração de Fe (mg L ⁻¹) (2)	-0,564 ± 0,078
Efeito de Interação de Segunda Ordem	
(1) X (2)	0,359 ± 0,078

A partir da análise do teste-*t* no nível de 95% de confiança as variáveis do planejamento fatorial (concentração de H₂O₂ e de Fe) foram consideradas como significativas, bem como o efeito de interação entre elas (Figura 4.1a). Isto significa que para a otimização da reação Fenton, como um preparo de amostra alternativo, as concentrações de H₂O₂ e de Fe não podem ser otimizadas de forma independente.



(A)



(B)

Figura 4.1. (A) Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados do planejamento fatorial no nível de confiança de 95% e (B) Gráfico do efeito de interação entre a concentração de H₂O₂ e de Fe para o planejamento fatorial 2².

Na aplicação da reação Fenton, como um preparo de amostra alternativo para a técnica de FAAS, observa-se uma redução no teor de Mn quando a concentração do H₂O₂ é elevada de 0,5 para 9,0 (% m/v) (Figura 4.1b). A avaliação da concentração de H₂O₂ é importante, pois, a disposição de radicais hidroxilas (•OH) no meio reacional é dependente dela. Se o peróxido de hidrogênio estiver em excesso pode ocorrer a formação de outros radicais (como por exemplo, o radical hidroperoxila, HO₂•) com potenciais de oxidação menores do que os

dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), reduzindo assim, a degradação da matéria orgânica e, conseqüentemente, diminuindo a eficiência da reação Fenton (GAMA, 2012). Desta forma, pode-se observar que se obteve um maior teor de Mn quando se fazia uso de uma menor concentração de H_2O_2 (0,5 %, m/v) (Figura 4.1b). Portanto, pode-se sugerir que esta concentração de H_2O_2 é suficiente para a geração de radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) e, conseqüentemente, para assegurar a eficiência da reação Fenton para a liberação de Mn da matriz do açúcar mascavo.

De forma similar, observa-se uma diminuição na concentração de Mn quando a concentração de Fe é elevada de 2,0 para 150,0 mg L^{-1} (Figura 4.1b). Na reação Fenton, o Fe é o responsável por iniciar e catalisar a decomposição do H_2O_2 , resultando na formação de radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) (NEYENS e BAEYENS, 2003). O aumento da concentração de Fe de 2,0 para 150 mg L^{-1} produziu uma redução no teor de Mn determinado por FAAS independentemente da concentração de H_2O_2 adotada (0,5 ou 9,0 (% , m/v)) (Figura 4.1b). Isso pode ser explicado pelo fato de que se a concentração de Fe for superior a concentração de H_2O_2 , pode ocorrer a coagulação química e, o excesso de Fe, também pode fazer os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) formados reagirem adicionando-se a anéis aromáticos e heterocíclicos presentes na matéria orgânica, diminuindo assim a eficiência da reação Fenton (NEYENS e BAEYENS, 2003).

Além dos efeitos principais foi observado também um efeito de interação significativo (Figuras 4.1a e 4.1b), indicando que as variáveis do planejamento fatorial não podem ser otimizadas de forma independente.

O aumento da concentração de Fe de 2,0 para 150 mg L^{-1} produziu uma redução no teor de Mn determinado por FAAS independentemente da concentração de H_2O_2 adotada (0,5 ou 9,0 (% , m/v)) (Figura 4.1b). Este efeito pode ser decorrente de uma coagulação química do Fe ou pela diminuição na concentração de radicais hidroxilas disponíveis para reagirem com a matéria orgânica como já descrito anteriormente. Por outro lado, quando a concentração de Fe e de H_2O_2 era reduzida ao nível baixo do planejamento fatorial (2,0 mg L^{-1} e 0,5% (m/v)) observou-se um aumento mais acentuado na concentração do metal avaliado, ou seja, que a concentração de Fe e de H_2O_2 adicionadas foram adequadas para favorecer a decomposição do H_2O_2 e, conseqüentemente, a formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) em quantidade suficiente para a mineralização da amostra e liberação de Mn para a solução (Figura 4.1b).

Assim, sugere-se que é imprescindível otimizar as concentrações de Fe e de H₂O₂, garantindo a máxima eficiência na degradação da matéria orgânica pela reação Fenton.

Os teores de Mn, obtidos no planejamento fatorial (Tabela 4.1) foram comparados aos determinados pela digestão por via seca e a digestão por via úmida (métodos adotados como referência) pela aplicação de um teste-*t* no nível de 95% de confiança. Os resultados da comparação da reação Fenton com a digestão por via úmida ($t_{\text{calculado}} = 0,760$, $p = 0,526$) indicaram que não existem diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostra comparados quando a condição 1 do planejamento fatorial é adotada (Tabela 4.1). A mesma comparação foi realizada com a digestão por via seca e diferenças significativas foram determinadas ($t_{\text{calculado}} = 6,800$, $p = 0,021$) entre os métodos de preparo de amostra avaliados. De acordo com os resultados da Tabela 4.1, pode-se verificar que a digestão por via seca produziu teores de Mn menores do que os observados pela digestão por via úmida e pela reação Fenton. Essa diferença pode ser decorrente de perdas por volatilização deste metal durante o procedimento da digestão por via seca (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Em vista destes resultados foi adotado o ensaio 1 da Tabela 4.1 (H₂O₂ 0,5 (%), m/v) e 2,0 mg L⁻¹ de Fe) como condição ótima para a determinação de Mn por FAAS aplicando-se a reação Fenton como preparo de amostra alternativo. Esta condição experimental é atrativa do ponto de vista econômico e ambiental, pois utiliza uma menor concentração de reagentes, produzindo assim, resíduos menos tóxicos ao meio ambiente, permite uma redução de custos da análise e apresenta uma maior rapidez quando comparada aos outros métodos convencionais de preparo de amostra.

Em relação aos métodos de preparo de amostra adotados como referência (digestão por via seca e digestão por via úmida) a reação Fenton apresenta outras vantagens, pois a amostra é preparada a temperatura ambiente, ou seja, não necessita de aquecimento, podendo assim, minimizar as perdas do analito por volatilização e utiliza uma concentração menor de H₂O₂ e de HNO₃ que, além de garantir a formação de radicais hidroxilas (*OH), pode ainda, evitar uma possível contaminação por meio de reagentes químicos (POHL, 2009; MAGALHÃES e ARRUDA, 1998).

4.1.2. Estudo de Validação da Reação Fenton

O estudo de validação para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS utilizando a reação Fenton, foi realizado de acordo com as recomendações de guias da Anvisa, Inmetro, ICH e AOAC e de artigos da literatura. Foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

4.1.2.1. Curvas Analíticas e Linearidade

A calibração instrumental para o Mn foi realizada por padronização externa em solução aquosa (PE) e por simulação de matriz (SM) por dissolução dos padrões em solução de sacarose 10% (m/v). Esta avaliação foi realizada com o objetivo de verificar possíveis interferências da matriz do açúcar mascavo durante as análises espectrométricas. Utilizou-se a sacarose devido ao fato deste carboidrato simular a matriz do açúcar mascavo, visto que este é um dos seus principais constituintes (JAFFÉ, 2015). Os dados obtidos para as curvas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) são apresentados na Tabela 4.3 e foram utilizados para os cálculos da regressão linear e na determinação do coeficiente de correlação linear (r).

Tabela 4.3. Parâmetros de calibração e dados do estudo de linearidade.

Validação da Linearidade								
Metal	Tipo de Calibração	Parâmetros da regressão			Regressão*		Falta de ajuste**	
		Equação***	r	R^2	$F_{calculado}$	p -valor	F_{faj}	p -valor
Mn	PE	$A = 0,00194 + 0,136 (\pm 0,006)$	0,998	99,7	2.628,3	0,000	0,16	0,916
Mn	SM	$A = 0,00790 + 0,125 (\pm 0,005)$	0,999	99,8	3.624,6	0,000	0,50	0,697

* $F_{crítico(0,05;1,8)} = 5,32$; ** $F_{crítico(0,05; 3, 5)} = 5,41$;***intervalos de confiança para a inclinação da curva analítica apresentados entre parêntesis.

A comparação dos intervalos de confiança dos coeficientes angulares das curvas analíticas de padrão externo e de simulação de matriz (Tabela 4.3 e Figura 4.2) demonstrou que o açúcar mascavo não apresenta efeito de matriz e as curvas analíticas de padrão externo podem ser utilizadas para a determinação de Mn por FAAS. A calibração por padrão externo tem como vantagens a análise de várias amostras do analito com a mesma curva de calibração, a análise do analito em uma ampla faixa de concentração, uma maior rapidez e um menor consumo de reagentes o que reduz o custo do ensaio (HARVEY, 2000).

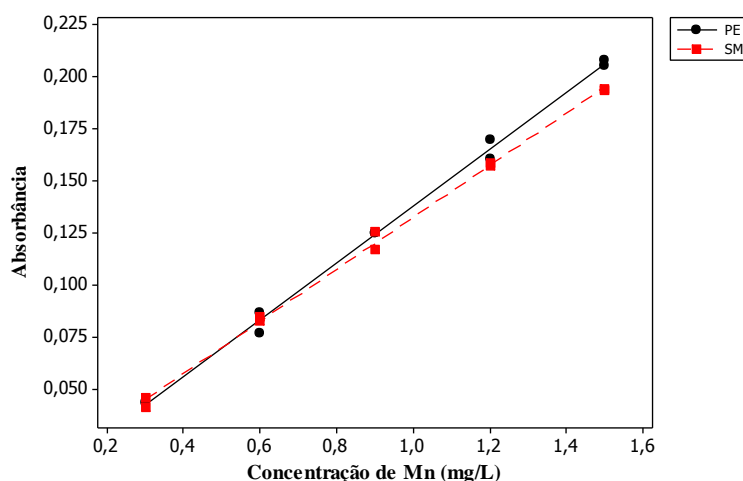


Figura 4.2. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Mn por FAAS.

O coeficiente de correlação linear ($r = 0,998$) demonstrou haver uma possível relação linear entre a absorbância e a concentração (BRASIL, 2011; ARAÚJO, 2009). Já o valor elevado para o coeficiente de determinação (R^2) indicou que mais de 99% dos dados experimentais são explicados pelo modelo linear e menos de 1,0% da variação pode ser atribuída aos resíduos (FREIRE *et al.*, 1999).

Para avaliar a linearidade da curva analítica de padrão externo foi aplicada uma análise de regressão linear simples no nível de 95% de confiança (Tabela 4.3). Os resultados sugeriram que a regressão linear é altamente significativa ($F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$ com $p < 0,05$) para a curva analítica de padrão externo. Para verificar se o modelo linear gerado se ajustava bem aos dados experimentais foi aplicado um teste de falta de ajuste no mesmo nível de confiança. Os resultados indicaram que a curva analítica apresenta linearidade na faixa de concentração investigada, sem falta de ajuste do modelo linear ($F_{\text{faj}} < F_{\text{crítico}}$ com $p > 0,05$). Para avaliar a significância dos coeficientes da curva analítica (a e b) e verificar se esta passava pela origem foi utilizado um teste- t no nível de 95% de confiança. Os resultados indicaram que o parâmetro a (coeficiente linear) da curva analítica não é significativo, pois $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ com $p > 0,05$ ($t_{\text{calculado}} = 0,73$; $t_{\text{crítico}(0,025;8)} = 2,31$; $p = 0,485$), podendo-se dessa forma assumir-se que a curva analítica passa pela origem ($a = 0$). Por outro lado, o parâmetro b (coeficiente angular) da curva analítica é significativo, pois $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ com $p < 0,05$ ($t_{\text{calculado}} = 51,27$; $t_{\text{crítico}(0,025;8)} = 2,31$; $p = 0,000$). Assim, a curva analítica de padrão

externo pode ser utilizada para a determinação de Mn em amostras de açúcar mascavo por FAAS, pois apresenta linearidade na faixa de concentrações estudada.

4.1.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o LQ representa a menor concentração da substância em análise que pode ser quantificada, através de um procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004). Assim, estes dois parâmetros foram utilizados para avaliar a sensibilidade do método de preparo de amostra proposto (reação Fenton) para a determinação de Mn em amostras de açúcar mascavo por FAAS e foram estimados a partir das equações 2.30 do item 2.6.4 e 2.31 do item 2.6.5, usando o método da curva analítica (BRASIL, 2003; ICH, 1996). Na Tabela 4.4 são apresentados os resultados obtidos desses parâmetros.

Tabela 4.4. Validação dos dados em testes de sensibilidade para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS usando a reação Fenton.

Metal	Reação Fenton		Digestão por Via Seca		Digestão por Via Úmida	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
Mn	0,032	0,106	0,010	0,033	0,046	0,152

Foram obtidos valores de LD e de LQ de 0,032 mg L⁻¹ e de 0,106 mg L⁻¹, respectivamente para a metodologia envolvendo a reação Fenton. Como estes valores de LD e de LQ foram inferiores ao primeiro ponto da curva analítica do Mn (0,3 mg L⁻¹) pode-se assumir que o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão adequadas na faixa linear de concentrações investigada. Os valores de LD e LQ obtidos pela aplicação da reação Fenton foram superiores aos determinados para a digestão por via seca (LD = 0,010 mg L⁻¹ e LQ = 0,033 mg L⁻¹). Isso pode ser explicado pelo fato da digestão por via seca utilizar uma menor quantidade de reagentes, os quais podem contribuir para a contaminação dos brancos usados no cálculo dos limites de detecção e de quantificação. Por outro lado, os valores de LD e de LQ da reação Fenton foram inferiores aos determinados para a digestão por via úmida (LD = 0,046 mg L⁻¹ e LQ = 0,152 mg L⁻¹) demonstrando que o método de preparo desenvolvido neste trabalho apresenta uma maior sensibilidade do que o método padrão. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato da reação Fenton quando comparada a digestão por via úmida

envolver menor manipulação e menor quantidade de reagentes, diminuindo assim o risco de contaminação da amostra em estudo.

4.1.2.3. Precisão e Exatidão

Os teores médios de Mn e seus respectivos desvios padrão determinados por FAAS para as amostras de açúcar mascavo aplicando-se a reação Fenton, como um método de preparo de amostra alternativo e os métodos de referência são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Teores médios de Mn e seus respectivos desvios-padrão obtidos para as amostras de açúcar mascavo aplicando-se a reação Fenton, a digestão por via seca e a digestão por via úmida como métodos de preparo de amostra.

<i>Amostra</i>	Concentração de Mn (mg/100g) \pm SD		
	<i>Reação Fenton</i>	<i>Digestão por Via Seca</i>	<i>Digestão por Via Úmida</i>
01A	1,28 \pm 0,02	1,26 \pm 0,00	1,21 \pm 0,01
02A	1,41 \pm 0,02	1,49 \pm 0,01	1,34 \pm 0,04
03B	0,55 \pm 0,01	0,24 \pm 0,04	0,52 \pm 0,00
04C	0,57 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,54 \pm 0,00
05D	1,83 \pm 0,02	1,91 \pm 0,08	2,16 \pm 0,01
06E	1,60 \pm 0,01	1,82 \pm 0,01	1,59 \pm 0,02
07F	0,37 \pm 0,01	0,23 \pm 0,08	0,42 \pm 0,00
08D	1,47 \pm 0,01	1,81 \pm 0,01	1,01 \pm 0,04
09G	4,26 \pm 0,13	3,74 \pm 0,08	4,31 \pm 0,20
10H	4,97 \pm 0,08	4,47 \pm 0,03	5,01 \pm 0,02

As digestões por via seca e por via úmida foram adotadas como referência por serem os métodos mais empregados para a digestão de amostras orgânicas e inorgânicas, os quais liberam os elementos de interesse a partir de estruturas moleculares (SARDANS, MONTES e PEÑUELAS, 2010).

4.1.2.3.1. Precisão

Para comprovar a confiabilidade da reação Fenton como método de preparo de amostra alternativo foi avaliada a sua precisão. Para isso as variâncias ponderadas dos métodos de preparo de amostra estudados (reação Fenton, digestão por via seca e digestão por via úmida) foram comparadas pela aplicação de um teste-*F* apropriado, utilizando-se

diferentes amostras de açúcar mascavo e avaliando-se a repetitividade expressa em desvios padrão relativos (RSD (%)). Na Tabela 4.6 estão apresentados os resultados desse parâmetro.

Tabela 4.6. Resultados do estudo de precisão (teste-*F*) da reação Fenton para a determinação de Mn por FAAS.

Metal	Reação Fenton x Digestão por Via Seca			Reação Fenton x Digestão por Via Úmida		
	$F_{calculado}$	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança	$F_{calculado}$	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança
Mn	1,13	0,849	0,30 – 4,21	1,77	0,383	0,48 – 6,57

$$F_{crítico(0,05;10;10)} = 3,72.$$

Os resultados do teste-*F* demonstraram que não existem diferenças significativas entre a precisão da metodologia utilizando a reação Fenton em relação aos métodos adotados como referência (digestão por via seca ($F_{calculado} = 1,13$ com $p = 0,849$) e digestão por via úmida ($F_{calculado} = 1,77$ com $p = 0,383$)), pois $F_{calculado} < F_{crítico}$ com $p > 0,05$. Estes resultados foram confirmados pelos respectivos intervalos de confiança para a razão das variâncias ponderadas da reação Fenton e digestão por via seca (0,30 – 4,21) e da reação Fenton e digestão por via úmida (0,48 – 6,57), os quais apresentaram limites inferiores a 1,0 (WERNIMONT, 1985).

As estimativas de repetitividade também foram consideradas apropriadas, uma vez que o valor encontrado de RSD = 2,6% foi menor do que o recomendado pela AOAC (RSD (%) < 7,3) para a faixa de concentrações de Mn determinada nas amostras de açúcar mascavo (AOAC, 2012). Desta forma, pode-se sugerir que o preparo de amostra envolvendo a reação Fenton apresenta precisão adequada para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS.

4.1.2.3.2. Exatidão

Para avaliar a exatidão da reação Fenton dois testes estatísticos foram aplicados (teste-*t* pareado e a análise de regressão linear no nível de 95% de confiança) aos teores de Mn determinados nas diferentes amostras de açúcar mascavo, bem como foram realizados ensaios de recuperação por adição de padrão. Na Tabela 4.7 estão apresentados os resultados do estudo de exatidão da reação Fenton.

Tabela 4.7. Estudo de exatidão da reação Fenton para a determinação de Mn em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

Metal	Processo Fenton x Digestão por Via Seca		Processo Fenton x Digestão por Via Úmida	
	<i>t_{calculado}</i>	<i>p-valor</i>	<i>t_{calculado}</i>	<i>p-valor</i>
Mn	1,02	0,334	0,28	0,783

$t_{crítico(0,025; 9)} = 2,26$.

Os resultados do teste-*t* pareado indicaram que não existem diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostra avaliados ($t_{calculado} = 1,02$ e $p = 0,334$ para a comparação da reação Fenton com a digestão por via seca; $t_{calculado} = 0,28$ e $p = 0,783$ para a comparação da reação Fenton com a digestão por via úmida) no nível de 95% de confiança, pois $t_{calculado} < t_{crítico}$ com $p > 0,05$.

Ensaio de recuperação por adição de padrão também foram realizados para garantir a exatidão da reação Fenton como método de preparo de amostra. Na Tabela 4.8 estão apresentados os resultados dos ensaios de recuperação da reação Fenton.

Tabela 4.8. Dados dos ensaios de recuperação da reação Fenton para a determinação de Mn em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

Concentração teórica adicionada (mg L ⁻¹)		Recuperação (%)	
<i>1º nível</i>	<i>2º nível</i>	<i>1º nível</i>	<i>2º nível</i>
0,3	0,6	90,7	97,5

As taxas de recuperação obtidas para a análise de Mn em açúcar mascavo por FAAS (90,7 - 97,5%) ficaram dentro dos limites recomendados pela AOAC (80 - 110%) para o intervalo de concentrações investigado (AOAC, 2012).

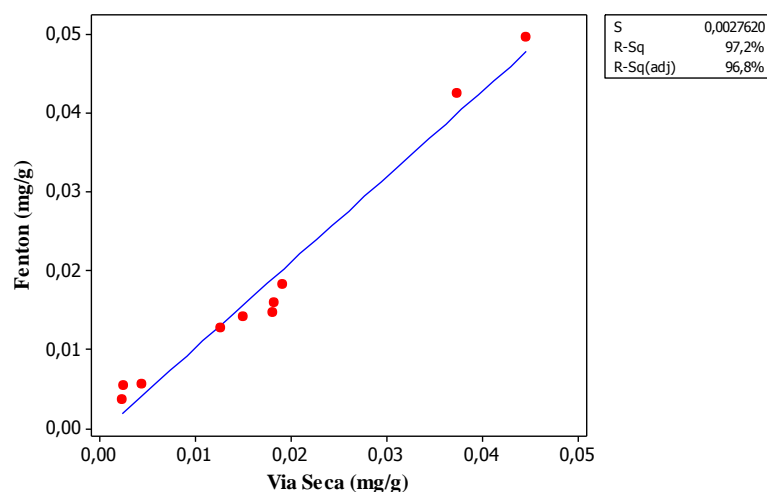
A exatidão da reação Fenton também foi avaliada pela técnica de regressão linear (Tabela 4.9). Esta técnica permite identificar a presença de erros sistemáticos, os quais podem afetar a exatidão dos métodos comparados (ANDRADE, 2014; MILLER e MILLER, 2005).

Tabela 4.9. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da reação Fenton como método de preparo de amostra.

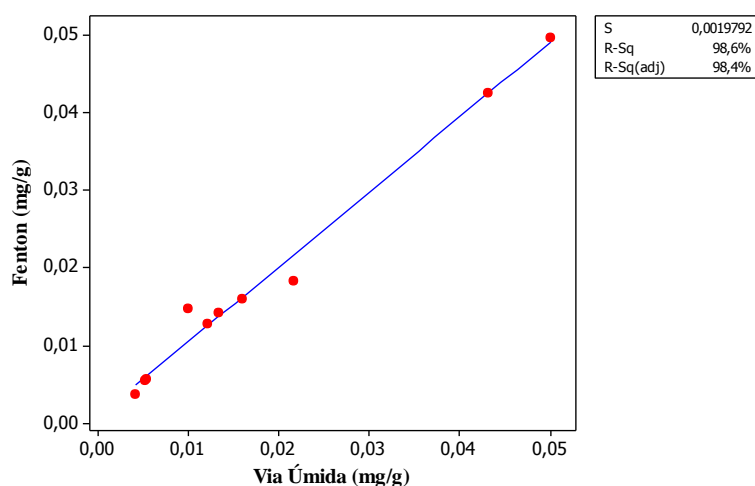
Reação Fenton x Digestão por Via Seca				
<i>F_{regressão}</i>	<i>p-valor</i>	<i>Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão</i>	<i>t_{calculado}</i>	<i>p-valor</i>
277,3 ^a	0,000	Intercepto: 0,00051 ± 0,00143	0,36 ^b	0,730
		Inclinação: 1,08234 ± 0,06500	16,65 ^b	0,000
Reação Fenton x Digestão por Via Úmida				
<i>F_{regressão}</i>	<i>p-valor</i>	<i>Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão</i>	<i>t_{calculado}</i>	<i>p-valor</i>
547,7 ^a	0,000	Intercepto: 0,00084 ± 0,00097	0,86 ^b	0,413
		Inclinação: 0,96327 ± 0,04116	23,40 ^b	0,000

^a $F_{\text{crítico}}(0,05; 1, 8) = 5,32$; ^b $t_{\text{crítico}}(0,025; 8) = 2,31$.

Os resultados demonstraram que o modelo linear é adequado para o metal avaliado (Tabela 4.9), e os teores de Mn apresentaram uma correlação linear entre os métodos de preparo de amostra comparados (reação Fenton, digestão por via seca e digestão por via úmida), o que pode ser ressaltado pelos elevados valores de $F_{\text{regressão}}$ observados. Para verificar a significância dos coeficientes da regressão linear (interceptos e inclinações) foi aplicado um teste- t no mesmo nível de confiança. Os resultados indicaram que as inclinações são significativas, pois os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram maiores do que o $t_{\text{crítico}}(0,025;8) = 2,31$ com valores de $p < 0,05$ (Tabela 4.9). A avaliação dos interceptos sugeriu que não havia significância estatística destes, uma vez que os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram menores do que o $t_{\text{crítico}}(0,025;8) = 2,31$ com valores de $p > 0,05$. Estes resultados comprovam que os métodos de preparo de amostra comparados (reação Fenton, digestão por via seca e digestão por via úmida) não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos, como pode ser visualizado na Figura 4.3.



(A)



(B)

Figura 4.3. Comparação por regressão linear dos métodos de preparo de amostra (A) reação Fenton e digestão por via seca e (B) reação Fenton e digestão por via úmida aplicados à determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS.

A reação Fenton e os métodos de preparo de amostra de referência (digestão por via seca e digestão por via úmida) mostraram uma relação funcional linear entre si (Figura 4.3). A partir destes resultados, pode-se sugerir que a reação Fenton como método de preparo de amostra alternativo apresenta uma boa exatidão para a determinação de Mn em açúcar mascavo por FAAS.

4.2. Aplicação da Reação de Foto-Oxidação UV para a Determinação de Zn e Mg em Açúcar Mascavo por FAAS

4.2.1. Estudo de Otimização da Reação de Foto-Oxidação UV

As condições experimentais para o preparo da amostra de açúcar mascavo pela reação de Foto-Oxidação UV foram otimizadas aplicando-se um planejamento fatorial 2^4 (Tabela 4.10) em que a influência de fatores como o volume de H_2O_2 30% (m/v) em mL, o pH da solução, a concentração da solução tampão em mol L^{-1} e o tempo de irradiação UV em minutos foi avaliada na eficiência da degradação da matéria orgânica. O estudo dos quatro fatores em dois níveis resultou em dezesseis condições reacionais diferentes, obtendo-se como resposta a degradação da amostra pela medida da absorbância da solução resultante no máximo comprimento de onda de absorção do açúcar mascavo que foi em 400 nm. Para esse estudo foram utilizadas massas de 1,5 g da amostra de açúcar mascavo número 10H. Na Tabela 4.10, é apresentada a matriz do planejamento fatorial 2^4 e os resultados da absorção do açúcar mascavo em 400 nm.

Tabela 4.10. Matriz do planejamento fatorial 2^4 para a otimização da reação de Foto-Oxidação UV como método alternativo de preparo de amostra para análise de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS.

Ensaio	Volume de H_2O_2 30% (m/v) (mL)	pH	Concentração do Tampão (mol L^{-1})	Tempo de Irradiação UV (min)	Absorbância (nm)
1	(-) 0,5	(-) 5	(-) 0,05	(-) 20	1,539
2	(+) 2,5	(-) 5	(-) 0,05	(-) 20	0,989
3	(-) 0,5	(+) 10	(-) 0,05	(-) 20	1,176
4	(+) 2,5	(+) 10	(-) 0,05	(-) 20	1,200
5	(-) 0,5	(-) 5	(+) 0,25	(-) 20	1,433
6	(+) 2,5	(-) 5	(+) 0,25	(-) 20	1,141
7	(-) 0,5	(+) 10	(+) 0,25	(-) 20	2,500
8	(+) 2,5	(+) 10	(+) 0,25	(-) 20	1,903
9	(-) 0,5	(-) 5	(-) 0,05	(+) 90	0,393
10	(+) 2,5	(-) 5	(-) 0,05	(+) 90	0,181
11	(-) 0,5	(+) 10	(-) 0,05	(+) 90	1,098
12	(+) 2,5	(+) 10	(-) 0,05	(+) 90	0,828
13	(-) 0,5	(-) 5	(+) 0,25	(+) 90	0,568
14	(+) 2,5	(-) 5	(+) 0,25	(+) 90	0,206
15	(-) 0,5	(+) 10	(+) 0,25	(+) 90	2,500

16

(+ 2,5

(+ 10

(+ 0,25

(+ 90

1,727

A partir da análise do gráfico de Pareto (Figura 4.4) é possível observar que todas as variáveis do planejamento fatorial são significativas (volume de H_2O_2 30% (m/v) em mL, pH, concentração da solução tampão em mol L^{-1} e tempo de irradiação UV em minutos no nível de 95% de confiança, bem como os efeitos de interação entre pH e concentração da solução tampão e entre pH e tempo de irradiação UV.

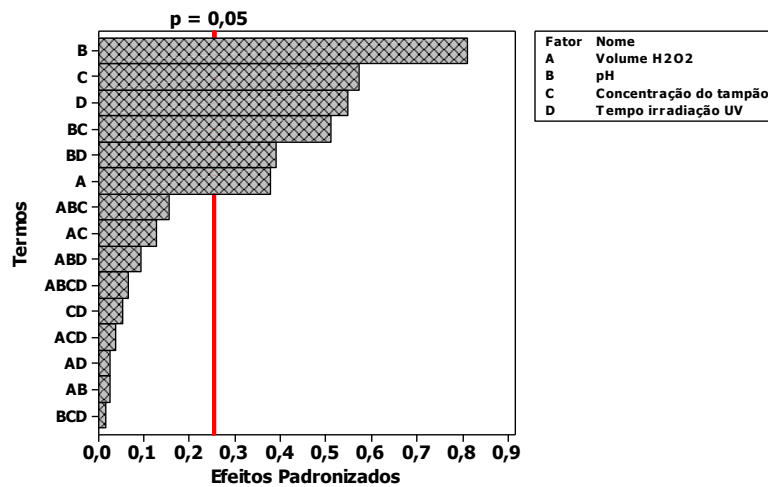


Figura 4.4. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do planejamento fatorial 2^4 .

Na Figura 4.5, são ilustrados os efeitos principais do planejamento fatorial que demonstram mais claramente a influência dos fatores investigados na degradação da matéria orgânica e, conseqüentemente, na eficiência da reação de Foto-Oxidação UV para a mineralização da amostra.

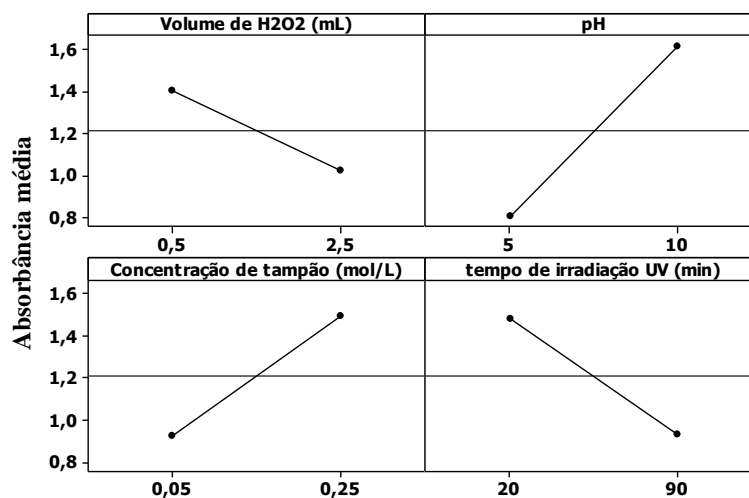


Figura 4.5. Diagrama para interpretação dos efeitos do planejamento fatorial 2^4 para a otimização da reação de Foto-Oxidação UV.

A concentração de H_2O_2 desempenha um papel muito importante para a geração dos radicais hidroxilas ($\bullet OH$) que são os responsáveis pela degradação da matéria orgânica (BORGHEI e HOSSEINI, 2008). A combinação da radiação UV com o H_2O_2 pode ser considerada como um dos processos oxidativos avançados mais eficientes para a degradação de compostos orgânicos (CATALKAYA e KARGI, 2007). Sabe-se que a degradação de algumas moléculas orgânicas pode ocorrer somente através da ação da radiação UV, ocorrendo a quebra de ligações e a geração dos radicais hidroxila ($\bullet OH$), mas a combinação da radiação UV com o H_2O_2 torna o processo ainda mais eficiente, pois os radicais hidroxila ($\bullet OH$) são formados a uma velocidade maior do que se utilizassem os dois reagentes (radiação UV e H_2O_2) separadamente (MACHADO, 2007). Sendo assim, pode-se observar na Figura 4.10, que aumentando o volume de H_2O_2 30% (m/v), de 0,5 mL para 2,5 mL, diminuiu significativamente a absorbância a 400 nm da solução de açúcar mascavo favorecendo a degradação da matéria orgânica.

A capacidade de geração dos radicais hidroxila ($\bullet OH$) é afetada pelo pH, assim como, a reatividade do H_2O_2 também depende do pH do meio (BORGHEI e HOSSEINI, 2008). Pode-se observar na Figura 4.5, que houve um decréscimo mais acentuado na absorbância em pH = 5,0, ou seja, que o processo de degradação é mais eficiente em meio ácido. Em meio alcalino ocorre uma diminuição da taxa de degradação devido à redução da concentração de radicais hidroxilas ($\bullet OH$), ou seja, nesta condição o H_2O_2 sofre foto-decomposição em água e

oxigênio, diminuindo assim, a eficiência do processo de mineralização (MURUGANANDHAM e SWAMINATHAN, 2004).

O estudo da concentração da solução tampão é importante para assegurar que o mesmo não interfere na reação de Foto-oxidação UV, uma vez que a própria solução tampão, quando em excesso, pode reagir com o H_2O_2 e diminuir a eficiência do processo. Foi observada uma menor redução da absorvância quando se fazia uso de concentrações de solução tampão com concentração igual a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ em relação à verificada para soluções tampão com concentrações de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 4.5). Isto indica que soluções tampão em concentrações menores não interferem no processo oxidativo avançado e atuam somente no tamponamento do pH. Nesse estudo foi utilizada uma solução tampão de $\text{pH} = 10,0$ preparada com carbonato de sódio (Na_2CO_3), o qual quando presente em concentrações maiores que $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pode se combinar com o H_2O_2 e formar um carbonato peroxihidrato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$) ou um peroxicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), reduzindo assim, a eficiência da reação de Foto-Oxidação UV (LEE, PARK e OLOMAN, 2000).

O tempo de irradiação UV está diretamente relacionado com a degradação da matéria orgânica. A irradiação UV é absorvida pelas moléculas de H_2O_2 gerando os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) (BORGHEI e HOSSEINI, 2008). Desta forma, aumentando o tempo de irradiação UV, eleva-se também, a quantidade de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e, conseqüentemente, maior será a eficiência na degradação da matéria orgânica. Portanto, pode-se observar na Figura 4.5, que houve um maior decréscimo na absorvância a 400 nm da solução de açúcar mascavo quando se fazia uso de um tempo de irradiação UV de 90 minutos.

Além dos efeitos principais foram observados também efeitos de interação entre pH e a concentração da solução tampão e entre pH e o tempo de irradiação UV. Isto indica que estas variáveis não podem ser otimizadas de forma independente.

Com relação ao efeito de interação entre pH e concentração da solução tampão foi observado que quando se fazia uso da solução tampão de $\text{pH} = 5,0$ obtinha-se a mesma redução na absorvância da solução de açúcar mascavo utilizando-se qualquer das concentrações investigadas ($0,05$ e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$) da solução tampão (Figura 4.6). No entanto, quando era empregada a solução tampão de $\text{pH} = 10,0$ para se obter a mesma redução na absorvância seria necessário reduzir a concentração da solução tampão para $0,025 \text{ mol L}^{-1}$. Estes resultados podem ser explicados pelo fato da solução tampão em $\text{pH} = 10$ ter sido preparada com Na_2CO_3 , o qual quando presente em excesso pode reagir com o H_2O_2 e

interferir na eficiência da reação de Foto-Oxidação UV (LEE, PARK e OLOMAN, 2000) como descrito anteriormente e mostrado nas reações (4.1) e (4.2):

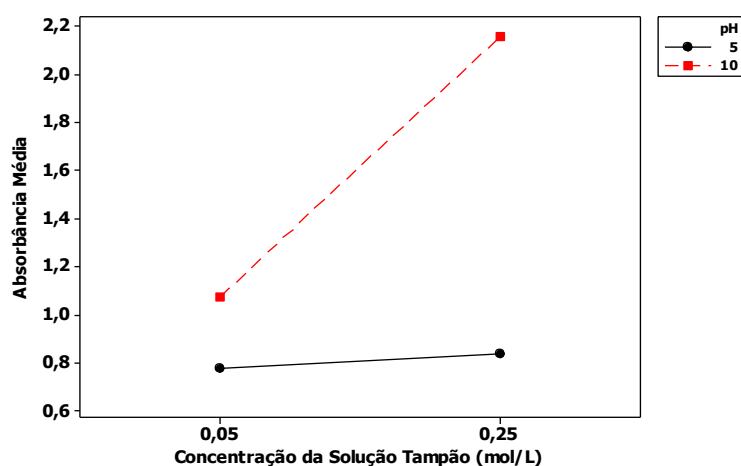
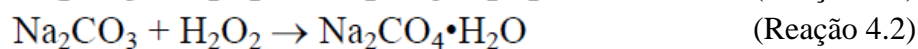
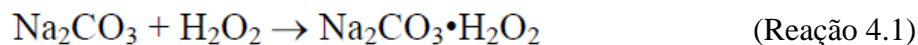


Figura 4.6. Gráfico de interação entre o pH e a concentração da solução tampão.

Em relação ao efeito de interação entre pH e tempo de irradiação UV foi observado que seria necessário um tempo muito elevado de irradiação em pH =10 para se obter a mesma redução da absorbância observada em pH = 5,0 e tempo de irradiação de 90 min (Figura 4.7).

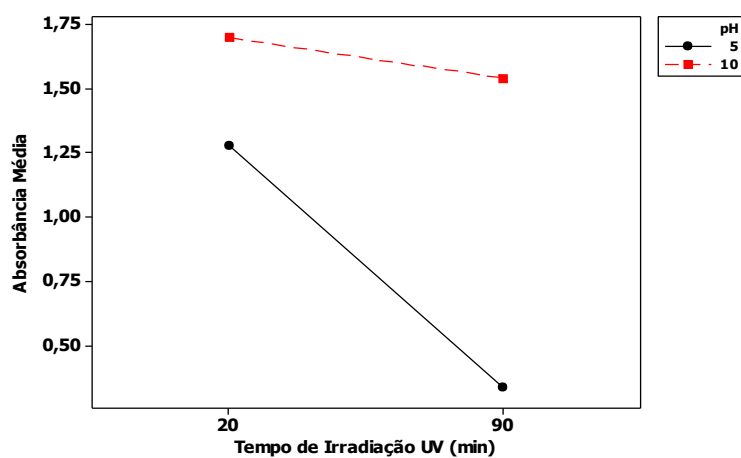


Figura 4.7. Gráfico de interação entre o pH e o tempo de irradiação UV.

Considerando-se que a diminuição da absorbância a 400 nm da solução de açúcar mascavo está relacionada diretamente com o aumento da degradação da matéria orgânica presente em solução, pode-se observar que o ensaio 10 foi o que apresentou a menor absorbância (0,181 nm) em relação aos demais (Tabela 4.10). Essa condição foi aplicada em duas amostras de açúcar mascavo (a amostra número 05D e a número 10H), a fim de obter os espectros de absorção molecular das amostras sem o pré-tratamento e após o tratamento de Foto-Oxidação UV, como mostrado na Figura 4.8, com a finalidade de visualizar a redução na absorbância após a Foto-Oxidação UV e, conseqüentemente, a eficiência na otimização dessa condição como preparo de amostra.

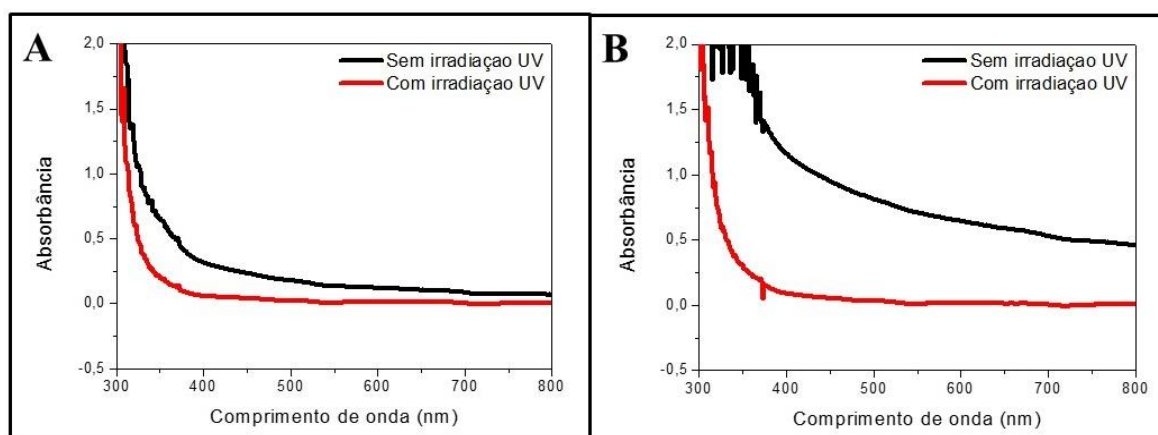


Figura 4.8. Espectros de absorção molecular obtidos para as amostras de açúcar mascavo: (A) 05D e (B) 10H. Linha preta: amostra antes do tratamento de Foto-Oxidação UV. Linha vermelha: amostra após o tratamento de Foto-Oxidação UV.

A partir da Figura 4.8, pode-se observar para ambas as amostras de açúcar mascavo de colorações distintas (clara e escura), que houve uma redução significativa da área espectral após o tratamento de Foto-Oxidação UV. Isto demonstra que o processo proposto é realmente eficiente para a degradação da matéria orgânica.

Desta forma, a condição 10 do planejamento fatorial foi aplicada na determinação de Zn e Mg por FAAS usando a reação de Foto-Oxidação UV como um método de preparo de amostra alternativo, ou seja, 2,5 mL de H₂O₂ 30% (m/v), pH = 5,0, concentração de solução tampão de acetato de 0,05 mol L⁻¹ e tempo de irradiação UV de 90 minutos e os resultados obtidos na análise da amostra 10H para estes metais são mostrados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Resultados do estudo do tempo de irradiação UV para a determinação de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS fazendo uso da reação de Foto-Oxidação UV. Os valores são expressos como médias e desvios-padrão em mg/100g.

Tipos de Preparo de Amostra	Metal (mg/100g)	
	Zn	Mg
<i>Digestão por Via Seca</i>	1,640 ± 0,057	144,22 ± 1,43
<i>Digestão por Via Úmida</i>	0,920 ± 0,014	95,80 ± 1,99
<i>Reação de Foto-Oxidação UV 90 minutos</i>	1,120 ± 0,000	130,60 ± 2,99
<i>Reação de Foto-Oxidação UV 105 minutos</i>	1,190 ± 0,014	141,59 ± 5,35
<i>Reação de Foto-Oxidação UV 120 minutos</i>	1,160 ± 0,000	147,84 ± 5,00

Comparando-se os resultados obtidos pela reação de Foto-Oxidação UV com tempo de irradiação UV de 90 minutos com os determinados pela digestão por via seca e pela digestão por via úmida (métodos adotados como referência), pode-se observar que os teores dos dois metais analisados (Zn e Mg) foram superiores aos teores determinados pelo método de digestão por via úmida, ou seja, demonstrando que existem diferenças significativas entre os dois métodos de preparo de amostra ($t_{calculado} = 18,34$; $p = 0,035$ para Zn e $t_{calculado} = 13,69$; $p = 0,046$ para Mg), pois $t_{calculado} > t_{crítico}$ com $p < 0,05$. Isso pode estar relacionado as perdas por volatilização dos metais que podem ocorrer no método de digestão por via úmida (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Comparando-se os teores dos metais propostos determinados pela reação de Foto-oxidação UV com os obtidos pela digestão por via seca observou-se que o processo ainda não estava completamente otimizado, pois foram obtidos teores médios significativamente mais baixos dos metais, como pode ser observado na Tabela 4.11, do que os encontrados pelo método de referência, ($t_{calculado} = 4,99$; $p = 0,038$ para Zn e $t_{calculado} = 5,81$; $p = 0,028$ para Mg), pois $t_{calculado} > t_{crítico}$ com $p < 0,05$.

Visando alcançar a otimização da reação de Foto-Oxidação UV, o tempo de irradiação UV foi elevado em intervalos de 15 minutos até alcançar-se teores médios similares aos do método de preparo de amostra adotado como referência (digestão por via seca). Com um tempo de irradiação UV de 105 minutos foram obtidos teores médios de Zn e Mg que não diferem significativamente dos determinados pela digestão por via seca ($t_{calculado} = 4,07$; $p = 0,055$ para Zn e $t_{calculado} = 0,67$; $p = 0,571$ para Mg), ou seja, $t_{calculado} < t_{crítico}$ com $p > 0,05$.

Então como condições ótimas da reação de Foto-Oxidação UV para os metais investigados, foram utilizados no estudo de validação um volume de 2,5 mL de H₂O₂ 30% (m/v), pH = 5,0, uma concentração de solução tampão de acetato de 0,05 mol L⁻¹ e um tempo de irradiação UV de 105 minutos.

4.2.2. Estudo de Validação da Reação de Foto-Oxidação UV Aplicada a Análise de Zn e Mg em Açúcar Mascavo

O estudo de validação para a determinação de Zn e Mg em amostras de açúcar mascavo utilizando a reação de Foto-Oxidação UV como um método de preparo de amostra alternativo por FAAS, foi realizado de forma similar ao adotado para a reação Fenton, avaliando-se os mesmos parâmetros. Todas as análises estatísticas foram realizadas no nível de 95% de confiança, utilizando o software estatístico Minitab for Windows versão 16.2.2 (MINITAB, 2010).

4.2.2.1. Curvas Analíticas e Linearidade

A calibração instrumental para os metais Zn e Mg foi realizada por padronização externa em solução aquosa (PE) e por simulação de matriz por dissolução dos padrões em solução de sacarose 10% (m/v). Esta avaliação foi realizada com o objetivo de verificar possíveis interferências da matriz do açúcar mascavo durante as análises espectrométricas. Utilizou-se a sacarose devido ao fato deste carboidrato simular a matriz do açúcar mascavo, visto que este é um dos seus principais constituintes como já descrito anteriormente (JAFFÉ, 2015). As curvas obtidas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) são apresentadas na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Zn e Mg por FAAS no nível de 95% de confiança.

Tipo de Calibração	Curva de Calibração	
	Zn	Mg
<i>PE</i>	$A = 0,0390 + 0,248 (\pm 0,08)^*$	$A = 0,0105 + 1,54 (\pm 0,19)^*$
<i>SM</i>	$A = 0,0330 + 0,220 (\pm 0,02)^*$	$A = 0,1080 + 1,41 (\pm 0,17)^*$

*Intervalos de confiança para a inclinação das curvas analíticas apresentados entre parêntesis.

Na Tabela 4.12, pode-se verificar através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas de padrão externo e de simulação de matriz, que o açúcar mascavo não apresenta efeito de matriz para os metais analisados e as curvas analíticas de padrão externo podem ser utilizadas para a determinação de Zn e Mg por FAAS fazendo uso da reação de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra, como ilustrado nas Figuras 4.9 e 4.10.

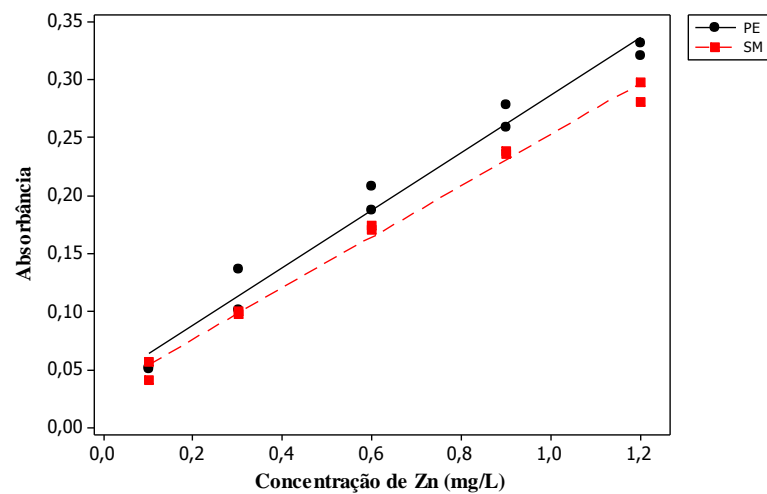


Figura 4.9. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Zn por FAAS utilizando a reação de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra.

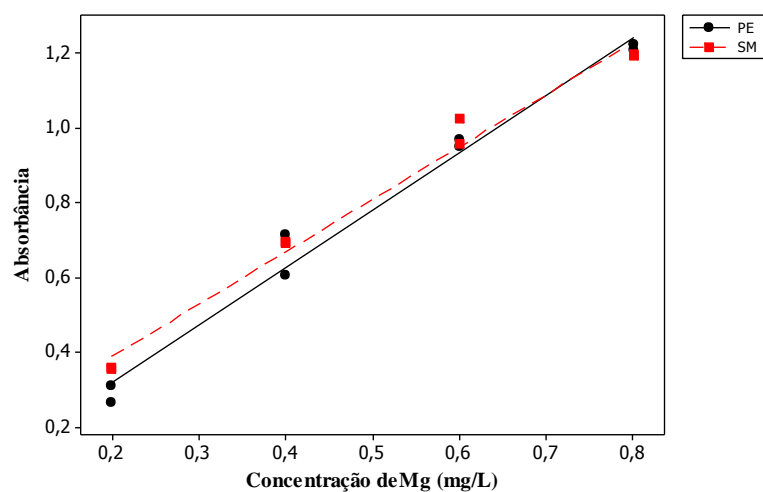


Figura 4.10. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Mg por FAAS utilizando a reação de Foto-Oxidação UV como preparo de amostra.

A linearidade pode ser entendida como a capacidade do método proposto em fornecer resultados proporcionais à concentração da substância que está sendo analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004). Para avaliar a linearidade das curvas analíticas foi aplicada uma análise de regressão linear simples no nível de 95% de confiança e um teste de falta de ajuste (Tabela 4.13).

Tabela 4.13. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.

Metais	Regressão		<i>r</i>	R ² (%)	Falta de ajuste	
	<i>F</i> _{calculado}	Valor de <i>p</i>			<i>F</i> _{faj}	<i>p</i> -valor
Zn	385,89 ^a	0,000	0,990	98,0	1,39 ^c	0,347
Mg	412,47 ^b	0,000	0,993	98,6	2,04 ^d	0,245

^a*F*_{crítico (0,05;1,8)} = 5,32; ^b*F*_{crítico (0,05;1,6)} = 5,99; ^c*F*_{crítico (0,05;3,5)} = 5,41; ^d*F*_{crítico (0,05;2,4)} = 6,94.

Os resultados sugeriram que a regressão linear é altamente significativa (*F*_{calculado} >> *F*_{crítico} com *p* < 0,05) para a curva analítica de padrão externo para os metais Zn e Mg. Os valores dos coeficientes de correlação linear iguais a *r* = 0,990 para o Zn e *r* = 0,993 para o Mg demonstram haver uma possível relação linear entre a absorvância e a concentração para os dois metais analisados (BRASIL, 2011; ARAÚJO, 2009; BRASIL, 2003). Já o valor elevado para o coeficiente de determinação (R²) indicou que mais de 98% dos dados experimentais são explicados pelo modelo linear e aproximadamente 2,0% da variação pode ser atribuída aos resíduos para ambos os metais (FREIRE *et al.*, 1999).

Para verificar se o modelo linear gerado se ajustava bem aos dados experimentais para os dois metais (Zn e Mg), foi aplicado um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança. Os resultados indicaram que as curvas analíticas apresentam linearidade na faixa de concentração investigada para ambos os metais, sem falta de ajuste do modelo linear (*F*_{faj} < *F*_{crítico} com *p* > 0,05 para ambos os metais). Para avaliar a significância dos coeficientes da curva analítica (*a* e *b*) de ambos os metais (Zn e Mg) e verificar se as curvas passavam pela origem (*a* = 0) foi utilizado um teste-*t* no mesmo nível de confiança. Para o Zn, os resultados indicaram que o parâmetro *a* (coeficiente linear) da curva analítica é significativo, pois *t*_{calculado} > *t*_{crítico} com *p* < 0,05 (*t*_{calculado} = 4,20; *t*_{crítico(0,025;8)} = 2,31; *p* = 0,003), podendo-se assim sugerir-se que a curva analítica não passa pela origem (*a* ≠ 0). O parâmetro *b* (coeficiente angular) da curva analítica também é significativo, pois *t*_{calculado} > *t*_{crítico} com *p* < 0,05 (*t*_{calculado} = 19,64; *t*_{crítico(0,025;8)} = 2,31; *p* = 0,000). Para o Mg, os resultados indicaram que o parâmetro *a* (coeficiente linear) da curva analítica não é significativo, pois *t*_{calculado} < *t*_{crítico}

com $p > 0,05$ ($t_{calculado} = 0,25$; $t_{crítico(0,025;6)} = 2,45$; $p = 0,810$), podendo-se assumir que a curva analítica passa pela origem ($a = 0$) e que o parâmetro b (coeficiente angular) da curva analítica é significativo, pois $t_{calculado} > t_{crítico}$ com $p < 0,05$ ($t_{calculado} = 20,31$; $t_{crítico(0,025;6)} = 2,45$; $p = 0,000$). Com isso, as curvas analíticas de padrão externo podem ser utilizadas para a determinação de Zn e Mg em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

4.2.2.2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada enquanto que o LQ representa a menor concentração da substância em análise que pode ser quantificada, através de um procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004). Assim, estes dois parâmetros foram utilizados para avaliar a sensibilidade do método de preparo de amostra proposto (reação de Foto-Oxidação UV) para a determinação de Zn e Mg em amostras de açúcar mascavo por FAAS e os dados obtidos são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Validação dos dados em testes de sensibilidade para a determinação de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS usando a reação de Foto-Oxidação UV.

Metais	Reação de Foto-Oxidação UV		Digestão por Via Seca	
	LD	LQ	LD	LQ
Zn	0,012	0,039	0,015	0,050
Mg	0,024	0,079	0,047	0,158

Os valores de LD e de LQ para os metais Zn e Mg foram estimados de acordo com as equações 2.30 do item 2.6.4 e 2.31 do item 2.6.5, usando o método da curva analítica (BRASIL, 2003). Assim, foram obtidos valores de LD e de LQ para o Zn de 0,012 mg L⁻¹ e de 0,039 mg L⁻¹ e para o Mg de 0,024 mg L⁻¹ e de 0,079 mg L⁻¹, respectivamente. Como estes valores foram inferiores ao primeiro ponto das curvas analíticas do Zn (0,1 mg L⁻¹) e do Mg (0,2 mg L⁻¹), pode-se assumir que o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão adequadas na faixa linear de concentrações investigadas para ambos os metais analisados.

Além disso, foi observado que os limites de detecção e de quantificação obtidos pela aplicação da reação de Foto-Oxidação UV, como método de preparo de amostra, apresentaram valores inferiores aos determinados para a digestão por via seca adotada neste trabalho como método de referência demonstrando que a reação de Foto-Oxidação UV

apresenta uma maior sensibilidade. Isto pode ser explicado pelo fato da reação de Foto-Oxidação UV não utilizar aquecimento, o qual pode promover a perda do analito de interesse por volatilização e por ser um processo que exige menor tempo de manipulação e menor quantidade de reagentes, diminuindo assim o risco de contaminação da amostra em estudo. Desta forma, pode-se afirmar através dos respectivos valores consideravelmente baixos destes limites que possíveis contaminações por reagentes foram minimizadas durante a aplicação da reação de Foto-Oxidação UV.

4.2.2.3. Precisão e Exatidão

Nas Tabelas 4.15 e 4.16 são apresentadas as concentrações médias e os desvios padrão de Zn e Mg nas amostras de açúcar mascavo obtidas utilizando a reação de Foto-Oxidação UV e a digestão por via seca como preparos de amostra.

Tabela 4.15. Teores médios de Zn obtidos em amostras de açúcar mascavo pela aplicação da reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca com seus respectivos desvios-padrão.

<i>Amostra</i>	Concentração de Zn (mg/100g) ± SD	
	<i>Reação de Foto-Oxidação UV</i>	<i>Digestão por Via Seca</i>
01A	0,68 ± 0,03	0,60 ± 0,09
02A	0,58 ± 0,01	0,49 ± 0,03
03B	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,09
04C	0,28 ± 0,03	0,15 ± 0,03
05D	0,62 ± 0,01	0,32 ± 0,09
06E	1,56 ± 0,02	1,60 ± 0,07
07F	0,42 ± 0,00	0,33 ± 0,04
08D	0,55 ± 0,01	0,53 ± 0,01
09G	0,90 ± 0,04	0,71 ± 0,07
10H	1,15 ± 0,01	1,64 ± 0,06

Tabela 4.16. Teores médios de Mg obtidos em amostras de açúcar mascavo pela aplicação da reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca com seus respectivos desvios-padrão.

<i>Amostra</i>	Concentração de Mg (mg/100g) \pm SD	
	<i>Reação de Foto-Oxidação UV</i>	<i>Digestão por Via Seca</i>
01A	151,43 \pm 0,96	121,05 \pm 1,06
02A	127,59 \pm 5,49	95,39 \pm 4,88
03B	35,60 \pm 7,14	21,04 \pm 1,10
04C	54,10 \pm 5,79	25,09 \pm 0,54
05D	70,99 \pm 3,44	52,89 \pm 4,04
06E	78,29 \pm 5,30	79,59 \pm 3,42
07F	34,63 \pm 1,54	22,20 \pm 0,01
08D	127,33 \pm 3,78	153,43 \pm 0,13
09G	133,44 \pm 3,20	88,09 \pm 2,63
10H	134,79 \pm 4,09	144,22 \pm 1,43

4.2.2.3.1. Precisão

Para comprovar a confiabilidade da reação de Foto-Oxidação UV, como método de preparo de amostra para a determinação de Zn e Mg em açúcar mascavo, realizou-se o estudo de precisão por meio da comparação das variâncias ponderadas da reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca, aplicando-se um teste-*F* apropriado, utilizando-se diferentes amostras de açúcar mascavo (Tabela 4.17).

Tabela 4.17. Resultados do estudo de precisão (teste-*F*) da reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg por FAAS.

Metal	Reação de Foto-Oxidação UV x Digestão por Via Seca		
	<i>F_{calculado}</i>	<i>p-valor</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
Zn	8,96	0,002	2,41- 33,29
Mg	3,14	0,085	0,85 – 11,67

$$F_{crítico(0,05;10;10)} = 3,72.$$

Os resultados do teste-*F* demonstraram que não existem diferenças significativas entre a precisão da reação de Foto-Oxidação UV em relação a digestão por via seca somente para o Mg, pois para este metal o valor de $F_{calculado} < F_{crítico}$ com $p > 0,05$. Este resultado também foi confirmado pelo respectivo intervalo de confiança para a razão das variâncias ponderadas, o qual apresentou limite inferior a 1,0 (WERNIMONT, 1985). No entanto, para o Zn foram encontradas diferenças significativas entre a precisão da reação de Foto-oxidação UV e a

digestão por via seca, pois $F_{calculado} > F_{crítico}$ com $p < 0,05$ e o respectivo intervalo de confiança para a razão das variâncias apresentou limite inferior maior que 1,0 (Tabela 4.17). Para verificar se a reação de Foto-Oxidação UV seria um método de preparo de amostra mais preciso do que a digestão por via seca foi aplicado novamente o teste- F de comparação das variâncias ponderadas monocaudal. Os resultados demonstraram que a reação de Foto-oxidação UV tem menores desvios padrão ponderados do que a digestão por via seca pois $F_{calculado} = 8,96$ é maior do que o $F_{crítico(0,05;10,10)} = 2,98$ com $p < 0,05$. Desta forma, pode-se sugerir que o preparo de amostra envolvendo a reação de Foto-Oxidação UV apresenta uma melhor precisão para a determinação de Zn e precisão similar para a determinação de Mg em amostras de açúcar mascavo por FAAS do que o método de referência (digestão por via seca).

4.2.2.3.2. Exatidão

Para avaliar a exatidão da reação de Foto-Oxidação UV, realizou-se a aplicação de testes estatísticos (teste- t pareado e a análise de regressão linear) no nível de 95% de confiança aos teores de Zn e Mg determinados nas diferentes amostras de açúcar mascavo. Nas Tabelas 4.18, 4.19 e 4.20 são apresentados os dados obtidos a partir do cálculo desses parâmetros.

Tabela 4.18. Estudo de exatidão da reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

Método	teste- t pareado			
	Zn		Mg	
	$t_{calculado}$	p -valor	$t_{calculado}$	p -valor
Reação de Foto-Oxidação UV x Digestão por Via Seca	0,58	0,576	2,12	0,063

$t_{crítico(0,025; 9)} = 2,26$.

Os resultados do teste- t pareado (Tabela 4.18) indicam que não existem diferenças significativas entre o método proposto (reação de Foto-Oxidação UV) e o método adotado como referência (digestão por via seca) para ambos os metais no nível de 95% de confiança, pois os valores de $t_{calculado}$ foram menores do que o $t_{crítico}$ com $p > 0,05$.

A exatidão da reação de Foto-Oxidação UV, também foi avaliada pela técnica de regressão linear (Tabelas 4.19 e 4.20), aplicada aos resultados apresentados nas Tabelas 4.15 e 4.16.

Tabela 4.19. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da reação de Foto-Oxidação UV como método de preparo de amostra alternativo para a determinação de Zn por FAAS.

$F_{regressão}$	p -valor	Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão	$t_{calculado}$	p -valor
<i>Reação de Foto-Oxidação UV x Via Seca</i>				
58,66 ^a	0,000	Intercepto: 0,00202 ± 0,00128	1,58 ^b	0,153
		Inclinação: 1,2361 ± 0,1614	7,66 ^b	0,000

^a $F_{crítico}(0,05; 1, 8) = 5,32$; ^b $t_{crítico}(0,025; 8) = 2,31$.

Tabela 4.20. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da reação de Foto-Oxidação UV como método de preparo de amostra alternativo para a determinação de Mg por FAAS.

$F_{regressão}$	p -valor	Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão	$t_{calculado}$	p -valor
<i>Reação de Foto-Oxidação UV x Via Seca</i>				
33,87 ^a	0,000	Intercepto: 0,1400 ± 0,1776	0,79 ^b	0,453
		Inclinação: 0,9946 ± 0,1709	5,82 ^b	0,000

^a $F_{crítico}(0,05; 1, 8) = 5,32$; ^b $t_{crítico}(0,025; 8) = 2,31$.

Os resultados apresentados nas Tabelas 4.19 e 4.20 demonstram que os modelos lineares são adequados para os metais avaliados e, os teores tanto de Zn quanto de Mg, apresentaram uma correlação linear entre os métodos de preparo de amostra comparados (reação de Foto-Oxidação UV e a digestão por via seca), o que pode ser ressaltado pelos valores observados de $F_{regressão}$ e $p < 0,05$.

Para verificar a significância dos coeficientes da regressão linear (intercepto e inclinação) foi aplicado um teste- t no mesmo nível de confiança para a comparação da reação de Foto-oxidação UV com a digestão por via seca. Os resultados indicaram que as inclinações para ambos os metais são estatisticamente iguais a 1,0, pois os valores de $t_{calculado} > t_{crítico}$ com $p < 0,05$. A avaliação dos interceptos sugeriu que não havia significância estatística destes,

uma vez que os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ com $p > 0,05$. Estes resultados comprovam que os métodos de preparo de amostra comparados (reação de Foto-Oxidação UV e a digestão por via seca) não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos (Figuras 4.11 e 4.12).

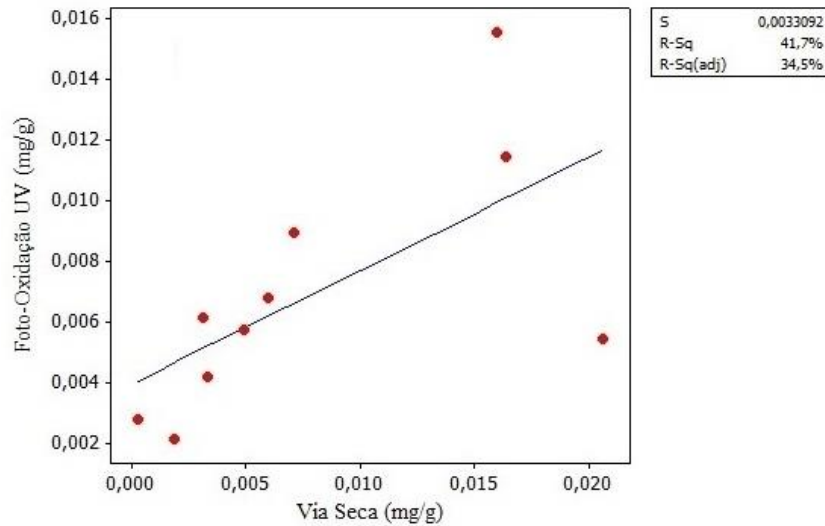


Figura 4.11. Comparação por regressão linear da reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca aplicadas como preparo de amostra à determinação de Zn em açúcar mascavo por FAAS.

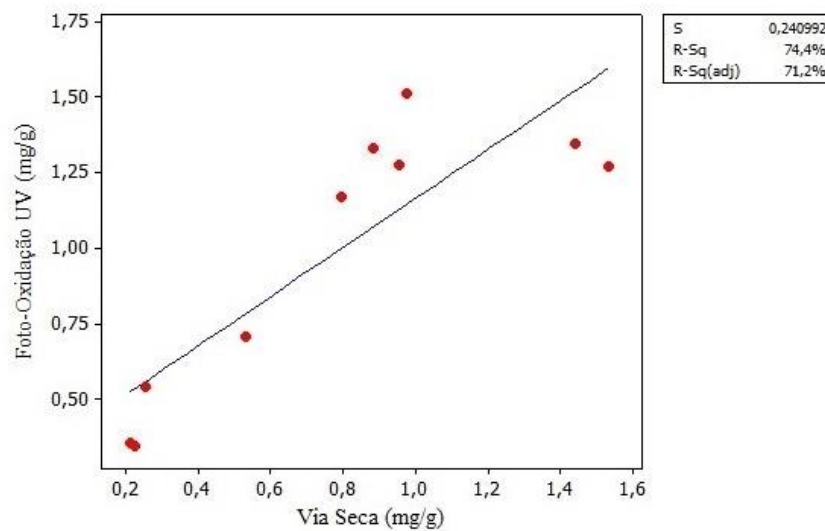


Figura 4.12. Comparação por regressão linear da Reação de Foto-Oxidação UV e da digestão por via seca aplicadas como preparo de amostra à determinação de Mg em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

As Figuras 4.11 e 4.12 ilustram uma relação funcional linear entre os métodos de preparo de amostra (reação de Foto-oxidação UV e a digestão por via seca) aplicados para a determinação de Zn e Mg em açúcar mascavo por FAAS. A partir destes resultados, pode-se sugerir que a reação de Foto-Oxidação UV, como método de preparo de amostra, apresenta uma boa exatidão para a determinação destes metais em açúcar mascavo por FAAS.

4.3. Digestão Ácida Assistida por Ultrassom como um Método de Preparo de Amostra para a Determinação de Fe por FAAS

4.3.1. Estudo de Otimização da Digestão Ácida Assistida por Ultrassom

A otimização das condições experimentais para a determinação de Fe usando a digestão ácida assistida por ultrassom como preparo de amostra foi realizada por ensaios univariados visando avaliar a influência da massa da amostra e o volume de água régia. Na Tabela 4.21, são apresentados os resultados obtidos a partir das condições de análise mostradas na Tabela 3.5 do item 3.6.3.

Tabela 4.21. Resultados do estudo de otimização univariado da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS. Os dados são apresentados como médias e desvios-padrão.

Condições*	Método/Processo	Amostra	Concentração Média (mg g ⁻¹) ± SD	Concentração Média Digestão por Via Seca (mg g ⁻¹) ± SD
1	Digestão assistida por ultrassom	10H	0,3303 ± 0,001	0,2495 ± 0,002
		07F	< LQ	0,0181 ± 0,001
2	Digestão assistida por ultrassom	10H	0,2833 ± 0,014	0,2495 ± 0,002
		07F	0,0248 ± 0,001	0,0181 ± 0,001

*Condição 1: 0,5 g de massa, 2,0 mL de água régia, 60 minutos de sonicação e volume final da solução de 25,0 mL; Condição 2: 1,5 g de amostra, 3,0 mL de água régia, 60 minutos de sonicação e volume final da solução de 25,0 mL.

Como já mencionado anteriormente, a eficiência do processo de digestão ácida assistida por ultrassom depende de vários fatores, como o tamanho das partículas, a massa da amostra, a temperatura do banho, a frequência do ultrassom, o tempo de sonicação e a concentração do agente extrator. Estes fatores podem ser considerados como parâmetros importantes para a eficiência do processo de digestão e devem ser otimizados (LEITE, 2015; BENDICHO *et al.*, 2012; DE LA CALLE *et al.*, 2009; SANTOS e CAPELO, 2007;

ARRUDA, RODRIGUEZ e ARRUDA, 2003; FILGUEIRAS, LAVILLA e BENDICHO, 2001).

A cor do açúcar mascavo é um parâmetro importante da aparência, pois além de ser percebido logo no primeiro contato do consumidor com o produto, pode também fornecer informação sobre o processamento (BETTANI *et al.*, 2014). Amostras escuras de açúcar mascavo possuem tamanho de partículas menores, decorrente do maior teor de impurezas (como partículas minúsculas de bagaço, sílica, sais minerais, gomas, partículas magnetizáveis, açúcar carbonizado, entre outras). Então amostras de açúcar mascavo de coloração escura, por possuírem cristais menores dissolvem-se mais rapidamente e, conseqüentemente necessitam de um tempo menor de sonicação (OLIVEIRA, ESQUIAVETO e SILVA JÚNIOR, 2007). Por outro lado, amostras de açúcar mascavo de coloração clara possuem maior tamanho de partícula, devido ao menor teor de impurezas e, conseqüentemente, maior cristalização da sacarose, necessitando de um tempo maior de sonicação para a completa dissolução da amostra. Na literatura, é possível observar que a maioria dos trabalhos utilizando a digestão ácida assistida por ultrassom para os mais diversos tipos de matrizes (plantas medicinais, vinho, leite, achocolatado em pó, sucos de frutas, solos, entre outras), conseguiram obter bons resultados na dissolução das amostras com tempos de sonicação entre 15 a 30 minutos. Porém, para as amostras de açúcar mascavo de coloração clara, como mencionado anteriormente, foi necessário um tempo maior de sonicação para se obter a completa dissolução (em torno de 45 a 50 minutos). Sendo assim, o tempo de sonicação foi fixado em 60 minutos, o qual foi eficiente para a dissolução das amostras de açúcar mascavo, independente de sua coloração.

Na produção do açúcar mascavo não se utiliza o processo de clarificação, o qual é responsável por remover o excesso de compostos fenólicos. Desta forma, a geração da coloração do produto se dá pela oxidação dos compostos fenólicos por ação das enzimas fenoloxidasas formando quinonas, sendo esta reação catalisada pela presença de metais como o Fe (BETTANI *et al.*, 2014). Assim, o Fe pode ser considerado como um agente ativo em reações químicas com os compostos fenólicos presentes no açúcar, o que pode levar a um escurecimento do produto acabado (OLIVEIRA, ESQUIAVETO e SILVA JÚNIOR, 2007). Com isso, pode-se afirmar que a intensidade da cor no açúcar mascavo está diretamente relacionada com o aumento da concentração de Fe devido às reações entre o Fe e os compostos fenólicos (THAMAPHAT *et al.*, 2015) e que este elemento pode estar fortemente

ligado a matriz devido a esses compostos responsáveis pela coloração, sendo necessária a utilização de um agente extrator forte para a efetiva extração do metal. Uma variedade de meios ácidos (como HNO_3 , HCl ou a mistura dos dois) tem sido empregado na digestão ácida assistida por ultrassom de metais dependendo do tipo de matriz e das interações do analito com a matriz (BENDICHO *et al.*, 2012; TADEO *et al.*, 2010). Por outro lado, misturas de ácido com H_2O_2 também são, muitas vezes, utilizadas para a extração de metais a partir de diferentes matrizes alimentares, pois a oxidação de amostras de alimentos com alto teor de matéria orgânica pode ser incompleta apenas com ácidos (TADEO *et al.*, 2010). Neste trabalho testou-se a mistura dos ácidos HNO_3 e HCl (conhecida como água régia) e esta mostrou-se eficiente na extração do metal Fe nas amostras de açúcar mascavo.

A condição 1, utilizada na otimização da digestão ácida assistida por ultrassom foi baseada no método proposto por Szymczycha-Madeja, Welna e Pohl (2014), em que os autores realizaram a solubilização de amostras de chás em água régia para a determinação de elementos por ICP OES. Em relação as condições estipuladas por estes autores, no presente estudo fez-se apenas a alteração no tempo de sonicação. No referido artigo os autores utilizaram um tempo de sonicação de 15 minutos e, como já mencionado anteriormente, as amostras de açúcar mascavo de coloração clara necessitam de um tempo maior de sonicação devido a maior cristalização da sacarose. Portanto, ao aplicar a condição utilizada no artigo observou-se que, para as amostras de açúcar mascavo, principalmente para as amostras claras, este tempo não seria suficiente para a total solubilização, sendo necessário um tempo maior de sonicação. Desta forma, o tempo de sonicação foi aumentado em intervalos de 15 minutos e observou-se que com 60 minutos houve a completa solubilização das amostras, tanto para as amostras de coloração clara quanto para as amostras de coloração escura. Em vista disso, o tempo de 60 minutos de sonicação foi adotado para todas as condições avaliadas durante o estudo de otimização.

Na condição 2, de forma univariada foram avaliadas a massa de amostra e o volume da solução extratora. Assim, a massa de amostra foi elevada de 0,5 g para 1,5g e o volume da solução extratora de 2,0 mL para 3,0 mL. O volume de água régia foi variado visando promover uma solubilização eficiente da amostra, pois com o aumento da massa de amostra de 0,5 g para 1,5g o volume de água régia utilizado na condição 1 (2,0 mL) poderia não ser suficiente para a solubilização do açúcar e, conseqüentemente, diminuir a eficiência do processo de extração do Fe da matriz do açúcar mascavo. A massa da amostra é um dos

fatores que deve ser levado em consideração na aplicação da digestão ácida assistida por ultrassom, pois a utilização de massas muito pequenas pode resultar na falta de homogeneidade e isso pode interferir nos resultados obtendo-se altos desvios padrão e, por outro lado, a utilização de massas muito grandes pode gerar aglomeração do material, podendo afetar a solubilização da amostra e, conseqüentemente, a eficiência do processo de extração (LEITE, 2015; DE LA CALLE *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos no estudo de otimização univariada foram comparados com os determinados pela digestão por via seca através da aplicação de um teste-*t* no nível de 95% de confiança. A aplicação da condição 1 (processo de digestão ácida assistida por ultrassom com massa de amostra de 0,5 g, volume de água régia de 2,0 mL, tempo de sonicação de 60 minutos e volume final da solução de 25,0 mL), produziu teores médios de Fe estatisticamente diferentes ($t_{\text{calculado}} = 41,41$; $p = 0,015$ para a amostra 10H e $t_{\text{calculado}} = 18,09$; $p = 0,035$ para a amostra 07F), ou seja, $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ com $p < 0,05$ em relação aos determinados pela digestão por via seca, demonstrando que existem diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostra comparados para ambas as amostras (amostra de coloração escura 10H e amostra de coloração clara 07F) e que esta não seria uma boa condição para as amostras de açúcar mascavo de coloração clara, pois obteve-se teores de Fe abaixo do limite de quantificação (LQ).

A aplicação da condição 2 (processo de digestão ácida assistida por ultrassom com massa de amostra de 1,5 g, volume de água régia de 3,0 mL, tempo de sonicação de 60 minutos) produziu teores médios de Fe maiores para as duas amostras analisadas ($t_{\text{calculado}} = 3,39$; $p = 0,183$ para a amostra 10H e $t_{\text{calculado}} = 67,00$; $p = 0,010$ para a amostra 07F) em relação aos obtidos pela digestão por via seca, demonstrando que não existem diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostra comparados para a amostra 10H (açúcar mascavo de coloração escura), pois $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ com $p > 0,05$ e que existem diferenças significativas para a amostra 07F (açúcar mascavo de coloração clara), pois $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ com $p < 0,05$.

Pode-se considerar que as condições 1 e 2 produziram teores de Fe similares aos obtidos pelo método adotado como referência, ou seja, a digestão por via seca, para a amostra de coloração escura (10H). Para a amostra de açúcar mascavo de coloração clara (07F), foram obtidos teores médios de Fe abaixo do limite de quantificação (LQ) para a condição 1 e teores médios de Fe maiores do que os determinados pelo método de referência para a condição 2,

indicando uma maior eficiência de extração do método de digestão ácida assistida por ultrassom para a amostra de coloração clara nesta condição. Levando-se em consideração estes fatores, a condição 2 foi adotada no estudo de validação para a determinação de Fe por FAAS, ou seja, massa de amostra de 1,5 g, 3,0 mL de água régia, 60 minutos de sonicação e volume final da solução de 25,0 mL.

4.3.2. Resultados da Validação da Digestão Ácida Assistida por Ultrassom

O estudo de validação para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo utilizando a digestão ácida assistida por ultrassom como método de preparo de amostra alternativo por FAAS compreendeu a análise dos parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão e toda a análise estatística foi realizada pelo software estatístico *Minitab for Windows* versão 16.2.2.

4.3.2.1. Curvas Analíticas e Linearidade

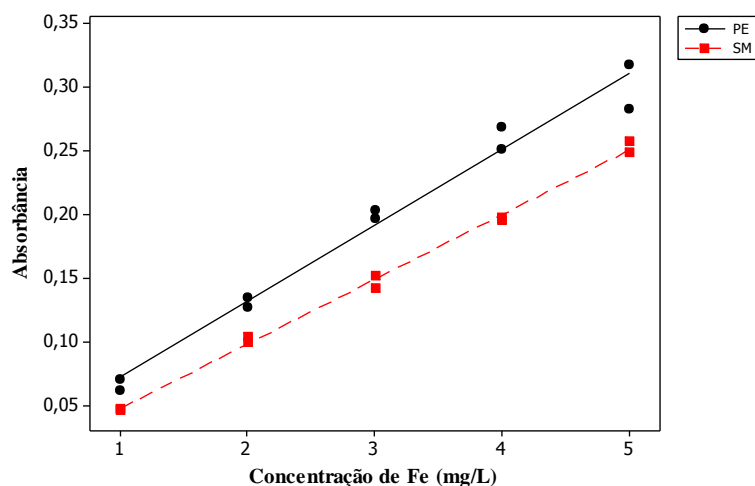
A calibração instrumental foi realizada por padronização externa em solução aquosa (PE) e por simulação de matriz por dissolução dos padrões em solução de sacarose 10% (m/v). Esta avaliação foi realizada com o objetivo de verificar possíveis interferências da matriz do açúcar mascavo durante as análises espectrométricas. Os dados obtidos nas curvas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) são apresentados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22. Curvas de Padrão Externo (PE) e de Simulação de Matriz (SM) para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS no nível de 95% de confiança.

Tipo de Calibração	Curva de Calibração
<i>PE</i>	$A = 0,01313 + 0,0595 (\pm 0,007)^*$
<i>SM</i>	$A = 0,00249 + 0,0507 (\pm 0,002)^*$

*Intervalo de confiança para a inclinação da curva analítica.

Na Tabela 4.22, pode-se observar através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas de padrão externo e de simulação de matriz, que o açúcar mascavo não apresenta efeito de matriz e a curva analítica de padrão externo pode ser utilizada para a determinação de Fe por FAAS fazendo uso da digestão ácida assistida por ultrassom como preparo de amostra, como ilustrado na Figura 4.13.



v

Figura 4.13. Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação de matriz (SM) para a determinação de Fe por FAAS.

Para avaliar a linearidade da curva analítica de padrão externo foi aplicada uma análise de regressão linear simples e um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança (Tabela 4.23).

Tabela 4.23. Dados da análise de regressão linear para a determinação de Fe por FAAS no nível de 95% de confiança.

Metal	Regressão		r	R^2 (%)	Falta de ajuste	
	$F_{calculado}$	p -valor			F_{faj}	p -valor
Fe	394,87 ^a	0,000	0,99	97,8	1,22 ^b	0,395

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

Os resultados da análise da regressão linear (Tabela 4.23) sugeriram que a regressão linear é altamente significativa ($F_{calculado} \gg F_{crítico}$ com $p < 0,05$) para a curva analítica de padrão externo. O coeficiente de correlação linear ($r = 0,99$) demonstrou haver uma possível relação linear entre a absorbância e a concentração, ou seja, ficou dentro dos limites recomendados pela literatura ($r > 0,99$) (BRASIL, 2011; ARAÚJO, 2009; BRASIL, 2003). Já o valor elevado para o coeficiente de determinação (R^2), o qual determina a variabilidade dos dados experimentais, indicou que mais de 97% destes são explicados pelo modelo linear e menos de 3,0% da variação pode ser atribuída aos resíduos (FREIRE *et al.*, 1999).

Para verificar se o modelo linear gerado se ajustava bem aos dados experimentais foi aplicado um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança. Os resultados indicaram que a curva analítica apresenta linearidade na faixa de concentração investigada, sem falta de ajuste do modelo linear ($F_{faj} < F_{crítico}$ com $p > 0,05$). Para avaliar a significância dos coeficientes da curva analítica (a e b) e se esta passava pela origem ($a = 0$) foi utilizado um teste- t no mesmo nível de confiança. Os resultados indicaram que o parâmetro a (coeficiente linear) da curva analítica não é significativo, pois $t_{calculado} < t_{crítico}$ com $p > 0,05$ ($t_{calculado} = 1,32$; $t_{crítico(0,025;8)} = 2,31$; $p = 0,223$), podendo-se assumir que a curva analítica passa pela origem ($a = 0$) e o parâmetro b (coeficiente angular) da curva analítica é significativo, pois $t_{calculado} > t_{crítico}$ com $p < 0,05$ ($t_{calculado} = 19,87$; $t_{crítico(0,025;8)} = 2,31$; $p = 0,000$). Assim, esses resultados demonstraram que a curva analítica de padrão externo pode ser utilizada para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

4.3.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram utilizados para avaliar a sensibilidade do método de preparo de amostra proposto (digestão ácida assistida por ultrassom) para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS e os dados obtidos são apresentados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24. Validação dos dados em testes de sensibilidade para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS.

Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) (mg L⁻¹)			
<i>Digestão ácida assistida por Ultrassom</i>		<i>Digestão por Via Seca</i>	
<i>LD</i>	<i>LQ</i>	<i>LD</i>	<i>LQ</i>
0,043	0,144	0,019	0,063

Os valores de LD e de LQ para o Fe foram estimados de acordo com as equações 2.30 do item 2.6.4 e 2.31 do item 2.6.5, usando o método da curva analítica (BRASIL, 2003). Utilizando este método de cálculo foram obtidos valores de LD e de LQ de 0,043 mg L⁻¹ e de 0,144 mg L⁻¹, respectivamente. Como estes valores foram inferiores ao primeiro ponto da curva analítica do elemento Fe (1,0 mg L⁻¹) pode-se assumir que o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão adequadas na faixa linear de concentrações investigadas. Além disso, foram estimados também os valores de LD e LQ para o método

adotado como referência, ou seja, para a digestão por via seca. Observou-se que os valores de LD e LQ obtidos a partir do método proposto (digestão ácida assistida por ultrassom) foram superiores aos determinados para a digestão por via seca. Isso pode ser explicado pelo fato da digestão por via seca utilizar menor quantidade de reagentes e o método proposto utilizar água régia, sendo uma mistura de ácidos concentrados (HCl e HNO₃) o que pode levar a contaminação dos brancos e elevar os valores de LD e de LQ.

4.3.2.3. Precisão e Exatidão

Na Tabela 4.25, são apresentadas as concentrações médias e os desvios padrão de Fe obtidos para as amostras de açúcar mascavo utilizando a digestão ácida assistida por ultrassom e a digestão por via seca como preparos de amostra.

Tabela 4.25. Teores médios de Fe obtidos em amostras de açúcar mascavo a partir da digestão ácida assistida por ultrassom e da digestão por via seca com seus respectivos desvios-padrão.

<i>Amostra</i>	Concentração de Fe (mg/100g) ± SD	
	<i>Digestão ácida assistida por ultrassom</i>	<i>Digestão por Via Seca</i>
1A	3,03 ± 0,18	3,36 ± 0,03
2A	31,74 ± 0,98	29,89 ± 0,29
3B	5,67 ± 0,18	1,95 ± 0,13
4C	6,43 ± 0,13	8,37 ± 0,79
5D	3,60 ± 0,04	1,84 ± 0,10
6E	7,44 ± 0,12	7,82 ± 0,04
7F	2,48 ± 0,13	2,36 ± 0,16
8D	4,67 ± 0,08	2,81 ± 0,02
9G	8,57 ± 0,27	6,11 ± 0,25
10H	28,33 ± 1,39	24,95 ± 0,21

4.3.2.3.1. Precisão

Para comprovar a confiabilidade da digestão ácida assistida por ultrassom como método de preparo de amostra, realizou-se o estudo de precisão por meio da comparação das variâncias ponderadas da digestão ácida assistida por ultrassom e da digestão por via seca, aplicando-se um teste-*F* apropriado, utilizando-se diferentes amostras de açúcar mascavo, em que os resultados estão apresentados na Tabela 4.26.

Tabela 4.26. Dados do estudo de precisão (teste- F e intervalos de confiança) da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

Metal	Digestão ácida assistida por ultrassom x Digestão por Via Seca		
	$F_{calculado}$	p -valor	Intervalo de confiança
Fe	3,55	0,058	0,95 – 13,18

$$F_{crítico(0,05;10;10)} = 3,72.$$

Os resultados do teste- F demonstraram que não existem diferenças significativas entre a precisão do método proposto, ou seja, o processo de digestão ácida assistida por ultrassom em relação ao método adotado como referência (digestão por via seca), pois, $F_{calculado} < F_{crítico}$ com $p > 0,05$. Estes resultados foram confirmados pelo respectivo intervalo de confiança para a razão das variâncias ponderadas, o qual apresentou limite inferior a 1,0 (Tabela 4.26) (WERNIMONT, 1985). Desta forma, pode-se sugerir que o preparo de amostra envolvendo a digestão ácida assistida por ultrassom apresenta precisão adequada para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

4.3.2.3.2. Exatidão

Para avaliar a exatidão da digestão ácida assistida por ultrassom realizou-se a aplicação de testes estatísticos (teste- t pareado e a análise de regressão linear no nível de 95% de confiança) aos teores de Fe determinados nas diferentes amostras de açúcar mascavo. Nas Tabelas 4.27 e 4.28 são apresentados os dados obtidos a partir do cálculo desses parâmetros.

Tabela 4.27. Dados do teste- t pareado da digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

Metal	Digestão Ácida Assistida por Ultrassom x Digestão por Via Seca	
	$t_{calculado}$	p -valor
Fe	2,17	0,058

$$*t_{crítico(0,025;9)} = 2,26.$$

Os resultados do teste- t pareado (Tabela 4.27) indicam que não existem diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostra, ou seja, entre a digestão ácida assistida

por ultrassom e a digestão por via seca, pois, o valor de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ com valor de $p > 0,05$ no nível de 95% de confiança.

A exatidão da digestão ácida assistida por ultrassom, também foi avaliada pela técnica de regressão linear (Tabela 4.28), aplicada aos resultados apresentados na Tabela 4.25.

Tabela 4.28. Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para a avaliação da exatidão da digestão ácida assistida por ultrassom como método de preparo de amostra para a determinação de Fe por FAAS.

Digestão ácida assistida por ultrassom x Digestão por Via Seca				
<i>F_{regressão}</i>	<i>p-valor</i>	<i>Coefficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão</i>	<i>t_{calculado}</i>	<i>p-valor</i>
283,32 ^a	0,000	Intercepto: 0,005689 ± 0,00796	0,71 ^b	0,495
		Inclinação: 0,93333 ± 0,05545	16,83 ^b	0,000

^a $F_{\text{crítico}}(0,05; 1, 8) = 5,32$; ^b $t_{\text{crítico}}(0,025; 8) = 2,31$.

Os resultados apresentados na Tabela 4.28, demonstram que o modelo linear é adequado para o metal avaliado e os teores de Fe apresentaram uma correlação linear entre os métodos de preparo de amostra comparados (digestão ácida assistida por ultrassom e a digestão por via seca), o que pode ser ressaltado pelo elevado valor de $F_{\text{regressão}}$ observado.

Para verificar a significância dos coeficientes da regressão linear (intercepto e inclinação) foi aplicado um teste- t no mesmo nível de confiança. Os resultados indicaram que a inclinação é significativa, pois o valor de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ com valor de $p < 0,05$. A avaliação do intercepto sugeriu que não havia significância estatística deste, uma vez que o valor de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ com valor de $p > 0,05$. Estes resultados comprovam que ambos os métodos de preparo de amostra comparados (digestão ácida assistida por ultrassom e a digestão por via seca) não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos, como visualizado na Figura 4.14.

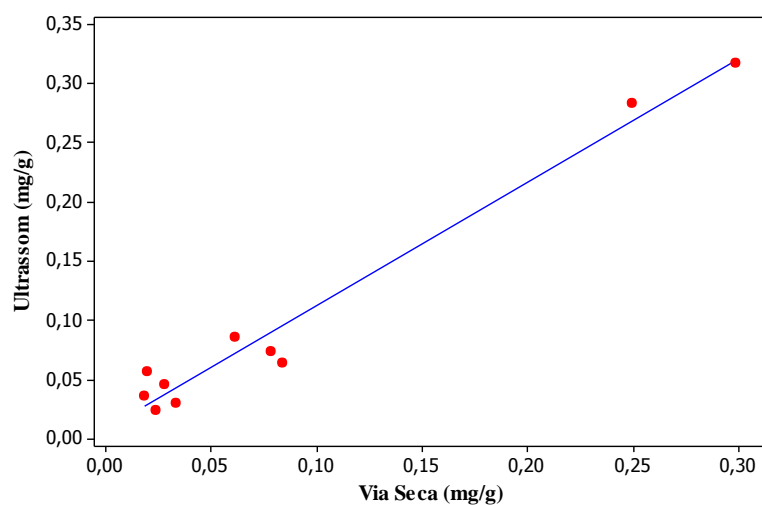


Figura 4.14. Comparação por regressão linear dos métodos de preparo de amostra (digestão ácida assistida por ultrassom e digestão por via seca) aplicados à determinação de Fe em amostras de açúcar mascavo por FAAS.

A Figura 4.14 ilustra uma relação funcional linear entre os métodos de preparo de amostra (digestão ácida assistida por ultrassom e a digestão por via seca) aplicados para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS. Portanto, pode-se sugerir que a digestão ácida assistida por ultrassom, como método de preparo de amostra, apresenta uma boa exatidão para a determinação deste metal em açúcar mascavo por FAAS.

CONCLUSÃO

De modo geral, a reação Fenton para a determinação de Mn, a reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg e a digestão ácida assistida por ultrassom para a determinação de Fe em açúcar mascavo por FAAS como métodos de preparo de amostra alternativos, mostraram-se adequados.

Os resultados obtidos demonstraram que os três métodos de preparo de amostra propostos são vantajosos em relação aos métodos convencionais (digestão por via úmida e digestão por via seca) devido a simplicidade, rapidez, baixo custo e confiabilidade para a análise de Mn, Zn, Mg e Fe em açúcar mascavo por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

A aplicação de planejamento fatorial permitiu a otimização da reação Fenton para a determinação de Mn por FAAS, em que foram estabelecidos os volumes de 0,35 mL de H_2O_2 e de 50 μ L de Fe como condições ótimas para a degradação da matéria orgânica presente nas amostras de açúcar mascavo e liberação de Mn da matriz.

A aplicação da reação de Foto-Oxidação UV para a determinação de Zn e Mg, também exigiu a otimização das condições analíticas por planejamento fatorial obtendo-se como melhor resultado a adoção de um volume de 2,5 mL de H_2O_2 , o ajuste do pH 5,0 com solução tampão de acetato 0,05 mol L^{-1} e um tempo de 105 minutos de irradiação UV para a degradação da matéria orgânica e liberação da matriz destes elementos. Da mesma forma, a otimização univariada da digestão ácida assistida por ultrassom demonstrou ser necessário utilizar uma solução extratora forte (3,0 mL de água régia) e um tempo de sonicação maior (60 minutos) do que o reportado na literatura devido a forte ligação do Fe a matriz do açúcar mascavo para uma quantificação confiável deste metal.

As quantificações dos quatro metais puderam ser realizadas através da padronização da curva analítica por padrão externo, a qual apresenta vantagens em relação aos demais tipos de padronizações, pois permite a análise de várias amostras do analito com a mesma curva de calibração e a análise do analito em uma ampla faixa de concentração, além de uma maior rapidez e um menor consumo de reagentes o que reduz o custo da análise de açúcar mascavo por FAAS.

Os parâmetros avaliados (linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão) no estudo de validação encontraram-se dentro dos critérios recomendados pela

literatura (ANVISA, AOAC e IUPAC), demonstrando que as metodologias propostas podem ser aplicadas em amostras de açúcar mascavo por FAAS, pois é possível obter dados precisos e exatos, de maneira rápida e com baixo custo quando comparados aos métodos convencionais de preparo de amostra. Além disso, estas metodologias analíticas de preparo de amostra apresentam características importantes, as quais permitem considerá-las como metodologias “mais limpas”, que minimizam a geração de resíduos perigosos e tóxicos, o consumo de energia e de reagentes químicos e oferecem maior segurança ao analista. Estes fatos tornam atrativa a implantação destes métodos de preparo de amostra em laboratórios de controle de qualidade, de indústrias e de órgãos de fiscalização de alimentos. Além disso, novas metodologias analíticas como as desenvolvidas neste trabalho, podem contribuir para o conhecimento da distribuição e concentração de minerais essenciais em açúcar mascavo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M. de; FONSECA, M. L.; MAGALHÃES, C. E. C.; LOPES, M. F. G.; LEMOS, T. L. G. de. Avaliação de Macro e Microminerais em Frutas Tropicais Cultivadas no Nordeste Brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 581-586, 2009.
- ANDRADE, C. K. DE.; ANJOS, V. E. DOS.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.; QUINÁIA, S. P. Direct Determination of Cd, Pb and Cr in Honey by Slurry Sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Food Chemistry**, v. 146, p. 166-173, 2014.
- ANDRADE, J. K. de. **Otimização e Validação de Metodologias Analíticas para Determinação de 5-(hidróximetil)-2-furaldeído (HMF) em Alimentos com Altos Teores de Açúcares**. Guarapuava, 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual do Centro-Oeste.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Métodos de Análise Oficiais da AOAC**. Apêndice F. Washington, 2012.
- ARAÚJO, E. R.; BORGES, M. T. M. R.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Qualidade de Açúcares Mascavo Produzidos em um Assentamento da Reforma Agrária. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 617-621, 2011.
- ARAÚJO, P. Key Aspects of Analytical Method Validation and Linearity Evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.
- ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no Preparo de Amostras por Microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.
- ARRUDA, S. C. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; ARRUDA, M. A. Z. Ultrasound-Assisted Extraction of Ca, K and Mg from In Vitro Citrus Culture. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 470-474, 2003.
- ASCHNER, M. Manganese: brain transport and emerging research needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 429-432, 2000.
- ASSIS, A. P. de; OKUMURA, L. L.; SACZK, A. A.; OLIVEIRA, M. F. New Voltammetry-Based Technique for the Determination of Tebuthiuron in Crystal and Brown Sugar Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 1, p. 27-35, 2014.
- AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTODIO, R. Faixa Linear de Uma Curva de Calibração. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, 8 p., 2000.
- BENDICHO, C.; DE LA CALLE, I.; PENA, F.; COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I. Ultrasound-Assisted Pretreatment of Solid Samples in the Contexto of Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50-60, 2012.

BERG, R. G.; MURTA, A. L. M.; KUGLER, W. O Método das Adições Padrão Aplicado à Análise Cromatográfica Quantitativa de Fenóis em Águas Residuais. **Química Nova**, v. 11, n. 2, p. 288-291, 1988.

BETTANI, S. R.; LAGO, C. E.; FARIA, D. A. M.; BORGES, M. T. M. R.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Avaliação Físico-Química e Sensorial de Açúcares Orgânicos e Convencionais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n. 2, p. 155-162, 2014.

BORGHEI, S. M.; HOSSEINI, S. N. Comparison of Furfural Degradation by Different Photooxidation Methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 139, n. 3, p. 482-488, 2008.

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

BRANDÃO, G. C. **Estratégias Alternativas de Preparo de amostras para a Determinação de Metais em Alimentos por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama**. 2010. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

BRANDÃO, G. C.; AURELIANO, M. O.; SHAUTIER, M. C. S.; SANTOS, W. N. L. Photo-Oxidation Using UV Radiation as a Sample Preparation Procedure for the Determination of Copper in Fruit Juices by Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Methods**, ed. 4, p. 855-858, 2012.

BRASIL. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. NBR ISO/IEC 17025, 31 p., 2005a.

BRASIL. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Sistemas de Gestão da Qualidade - Fundamentos e Vocabulário**. NBR ISO/IEC 9000, 26 p., 2000.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Resolução RE n. 899, 15 p., 2003a.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Normatização Brasileira Relativa a Açúcar Mascavo, Melado e Rapadura**. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução CNNPA n. 12/33, 03 p., 1978.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais**. Resolução RDC 269, 06 p., 2005b.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Valores Diários de Referência de Nutrientes (vdr) de Declaração Obrigatória**. Resolução n. 360 de 2003. Disponível em: < www.anvisa.gov.br > Acesso em: 14 jan. 2015.

BRASIL. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estudo Nacional da Despesa Familiar**. Tabelas de Composição dos Alimentos. Rio de Janeiro: Fundação IBGE, 1976. 172 p.

BRASIL. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008, r. 02, 24 p., 2007.

BRASIL. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**, Revisão 04, julho de 2011. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: 14 abril 2015.

BRASIL. SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Estudo Técnico das Alternativas de Aproveitamento da Cana-de-açúcar**. Belo Horizonte, MG, 2004.

BRITO, J. M.; RANGEL, M. C. Processos Avançados de Oxidação de Compostos Fenólicos em Efluentes Industriais. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 114-122, 2008.

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

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent Applications of Sample Preparation Techniques in Food Analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 47-70, 2002.

CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL, F. C. Métodos de Baixo Custo para Purificação de Reagentes e Controle da Contaminação para a Determinação de Metais Traços em Águas Naturais. **Química Nova**, v. 25, p. 808-813, 2002.

CAPELO, J. L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of Parameters Associated with the Ultrasonic Solid-Liquid Extraction for Elemental Analysis (Total Content) by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. An Overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, p. 225-232, 2005.

CAPELO-MARTÍNEZ, J. L.; XIMÉNEZ-EMBÚN, P.; MADRID, Y.; CÁMARA C. Advanced Oxidation Processes for Sample Treatment in Atomic Spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 331-340, 2004.

CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; NÓBREGA, A. W.; ABRANTES, S. M. P. Validação de Método para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 63-72, 2010.

CARRILHO, E. N. V. M.; GONZALEZ, M. H.; NOGUEIRA, A. R. A.; CRUZ, G. M.; NÓBREGA, J. A. Microwave-Assisted Acid Decomposition of Animal and Plant Derived

Sample for Element Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 15, p. 4164-4168, 2002.

CASTILLO ORTIZ, M. I.; GANCHOZO MONCAYO, M. F. **Proyecto de Inversión: elaboración e y comercialización de la panela granulada “nutripanela” em la ciudad de Guayaquil**. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica Del Litoral, 2004. Proyecto de grado previo a la obtención del título de Economista com mención em Gestión Empresarial, especialización Finanzas y Marketing. 132 p.

CATALKAYA, E. C.; KARGI, F. Color, TOC and AOX Removals from Pulp Mill Effluent by Advanced Oxidation Processes: a comparative study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 39, n. 2, p. 244-253, 2007.

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

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606 p.

COSTA, A. I. A.; JONGEN, W. M. F. New Insights Into Consumer-Led Food Product Development. **Trends in Food Science Technology**, v. 17, n. 8, p. 457-465, 2006.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Calibration in Chemical Measurement Processes. II. A Methodological Approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 620-633, 2001.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; EGEE-GONZÁLEZ, F. J.; CANO, M. L. C.; FRENICH, A. G.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L. Correction Function on Biased Results Due to Matrix Effects Application to the Routine Analysis of Pesticide Residues. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 281-301, 2003.

DE LA CALLE, I.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Analytical Evaluation of a Cup-Horn Sonoreactor Used for Ultrasound-Assisted Extraction of Trace Metals from Troublesome Matrices. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, n. 9, p. 874-883, 2009.

DELGADO, A. A.; AZEREDO CÉSAR, M. A. **Elementos de Tecnologia e Engenharia do Açúcar de Cana**. v. II. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1977.

DELGADO, A. D.; DELGADO, A. P. **Produção do Açúcar Mascavo, Rapadura e Melado**. Piracicaba: ALVES, 1999. 154 p.

DOS ANJOS, V. E.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Comparação da Labilidade de Metais Empregando Voltametria, Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração (DGT) e Modelo Computacional. **Química Nova**. v. 33, p. 1307-1312, 2010.

DUTRA, M. J. A.; SANTOS, D. M.; COELHO, N. M. M. Comparação de Procedimentos Analíticos para Preparo de Amostras para Determinação de Cálcio e Magnésio em Leite. **Revista Analytica**, n. 12, p. 36-40, 2004.

EGEA GONZALEZ, F. J.; TORRES, M. E. H.; LOPEZ, E. A.; CUADROS-RODRIGUEZ, L.; VIDA, J. L. M. Matrix-Effects of Vegetable Commodities in Electron-Capture de Dtection Applied to Pesticide Multiresidue Analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 155-165, 2002.

EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Processamento Artesanal da Cana-de-açúcar: fabricação de açúcar mascavo**. Belo Horizonte: EMATER, 1999. 05 p.

FAVA, A. R. Atletas Ingerem Garapa para Repor Energia. **Jornal da Unicamp**. ed. 250. 3-9 maio 2004. Disponível em: < http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju250pag08.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2015.

FILGUEIRAS, A. V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-Assisted Solubilization of Trace and Minor Metals from Plant Tissue Using Ethylenediaminetetraacetic Acid in Alkaline Médium. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, p. 451-456, 2001.

FRAGA, C. G. Relevance, Essentiality and Toxicity of Trace Elements in Human Health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 235-244, 2005.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Iron Toxicity and Antioxidant Nutrients. **Toxicology**, v. 180, p. 23-32, 2002.

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

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

GOLIMOWSKI, J.; GOLIMOWSKA, K. UV-Photo-Oxidation as Pretreatment Step in Inorganic Analysis of Enviromental Samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, p. 111-133, 1996.

GOMES, L. M. **Estudo da Otimização do Processo Fenton para o Descoramento de Corantes Azo**. 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado de Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

GONÇALVES, E. C. B. A.; TEODORO, A. J.; TAKASE I. Teores de Cobre em Extratos de Carne in Natura e Processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 298-302, 2007.

GROMBONI C. F.; FERREIRA, A. G.; KAMOGAWA, M. Y.; NOGUEIRA, A. R. A. Evaluation of the Photo-Fenton Reaction in the Decomposition of Tick Residues. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 264-267, 2007a.

GROMBONI, C. F.; CARAPELLI, R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; NOGUEIRA, A. R. A. Evaluation of Different Sample Preparation Procedures Using Chemometrics: comparison among photo-fenton reaction, microwave irradiation, and direct determination of minerals in fruit juices. **Food Analytical Methods**. v. 3; n. 2, p. 98-103, 2010.

GROMBONI, C. F.; KAMOGAWA, M. Y.; FERREIRA, A. G.; NÓBREGA, J. A; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-Assisted Photo-Fenton Decomposition of Chlorfenvinphos and Cypermethrin in Residual Water. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 185, n. 1, p. 32-37, 2007b.

GUERRA, M. J.; MUJICA, M. V. Physical and Chemical Properties of Granulated Cane Sugar “Panelas”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 250-257, 2010.

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

HAHN, S. T. High-Intensity Focused Ultrasound in the Solid Tumor Treatment. **Journal of the Korean Medical Association**, v. 49, n. 8, p. 707-716, 2006.

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

HOENIG, M.; KERSABIEC, A. M. Sample Preparation Steps for Analysis by Atomic Spectroscopy Methods: present status. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p. 1297-1307, 1996.

HUANG, C. P.; DONG, C.; TANG, Z. Advanced Chemical Oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Management**, v. 13, p. 361-377, 1993.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. IV ed. 1 ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=+com_remository&Itemid=0&func=select&orderby=1>. Acesso em: 20 jun. 2014.

ICH - International Conference on Harmonisation. Commission of the European Communities. **Validation of Analytical Procedures: methodology**. Geneva: ICH, 1996.

JAFFÉ, W. R. Health Effects of Non-Centrifugal Sugar (NCS): a review. **Sugar Technology**. v. 14, n. 2, p. 87-94, 2012.

JAFFÉ, W. R. Nutritional and Functional Componentes of Non Centrifugal Cane Sugar: a compilation of the data from the analytical literature. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 43, p. 194-202, 2015.

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

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

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. de. **Espectrometria de Absorção Atômica: fundamentos e atomização com chama**. Parte 1. [S.l.: s.n.], 2004.

LEE, H. H. B.; PARK, A.; OLOMAN, C. Stability of Hydrogen Peroxide in Sodium Carbonate Solutions. **Tappi Journal Peer Reviewed Paper**, 2000. Disponível em: <<http://www.columbia.edu/~ap2622/pdf/Stability%20of%20hydrogen%20peroxide%20in%20sodium%20carbonate.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical Processes for Water Treatment. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 2, p. 671-698, 1993.

LEITE, D. P. **Estudo de Métodos para a Determinação de As, Cd, Pb, Cr e Se em Fertilizantes Base Orgânica por AAS e ICP OES**. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

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**, v. 95, n. 4, p. 644-652, 2006.

LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. **Produção de Açúcar Mascavo, Rapadura e Melado de Cana**. Araras: SEBRAE, 44 p., 1998.

MACHADO, L. L. **Utilização de Compósito Carvão/Fe₂O₃ e Pirita como Catalisadores da Peroxidação de Efluentes Têxteis**. 2007. 149f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Processos Químicos e Biotecnológicos – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z. Amostragem de Suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 459-466, 1998.

MARTÍN-ESTEBAN, A.; GARCUNUNO, R. M.; ANGELINO, S.; FERNÁNDEZ, P.; CÁMARA, C. Determination of Trace Metals in Waters an Compost by On-line Precipitation

Coupled to Flame Atomic Absorption Spectrophotometry or Ion Chromatography. **Talanta**, v. 48, p. 959-966, 1999.

MÉNDEZ, H.; ALAVA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasonic Extraction Combined with Fast Furnace Analysis as an Improved Methodology for Total Selenium Determination in Seafood by Electrothermal-Atomic Absorption Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 452, p. 217-222, 2002.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5. ed. Harlow: Pearson Prentice Hall, 2005. 268 p.

MILLIKAN, M. Nutritional Metals in Foods by AAS. **Intechopen**, p. 143-146, 2012.

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

MURUGANANDHAM, M; SWAMINATHAN, M. Photochemical Oxidation of Reactive Azo Dye with UV-H₂O₂ Process. **Dyes and Pigments**, v. 62, n. 3, 269-275, 2004.

NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Direct Determination of Cu and Zn in Fruit Juices and Bovine Milk by Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Talanta**, v. 64, p. 912-917, 2004.

NATA. **Guidelines for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods**. 32 p., 2012.

NATALINO, R. **Caracterização de Açúcar Mascavo Aplicando Análise das Componentes Principais a Dados Espectrométricos**. 2006. 52 p. Dissertação (Magister Scientiae em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, MG.

NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**. v. 98, n. 1-3, p. 33-50, 2003.

NOGUEIRA, A. R. A.; MATOS, A. O.; CARMO, C. A. F. S.; SILVA, O. J.; MONTEIRO, F. L.; SOUZA, G. B.; PITTA, G. V. E.; CARLOS, G. M.; OLIVEIRA, H.; COMASTRI FILHO, J. A.; MIVAZAWA, M.; OLIVEIRA NETO, W. Tecido Vegetal. In: NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. cap. 8, p. 145-199.

NOGUEIRA, F. S.; FERREIRA, K. S.; CARNEIRO JUNIOR, J. B.; PASSONI, L. C. Minerais em Melados e em Caldos de Cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 727-731, 2009.

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.

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

OLIVEIRA, D. T.; ESQUIAVETO, M. M. M.; SILVA JÚNIOR, J. F. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 99-102, 2007.

ONIANWA, P. C.; ADEYEMO, A. O.; IDOWU, O. E.; OGABIELA, E. E. Copper and Zinc Contents of Nigerian Foods and Estimates of the Adult Dietary Intakes. **Food Chemistry**, v. 72, p. 89-95, 2001.

PAPADOPOULOS, A. E.; FATTA, D.; LOIZIDOU, M. Development and Optimization of Dark Fenton Oxidation for the Treatment of Textile Wastewaters with High Organic Load. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, n. 3, p. 558-563, 2007.

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

POHL, P. Determination of Metal Content in Honey by Atomic Absorption and Emission Spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 117-128, 2009.

POHL, P.; SERGIEL, I. Evaluation of the Total Content and the Operationally Defined Species of Copper in Beers and Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9378-9384, 2009.

POHL, P.; SERGIEL, I.; PRUSISZ, B. Direct analysis of honey for the total content of Zn and its fractionation forms by means of flame atomic absorption spectrometry with solid phase extraction and ultrafiltration approaches. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1504-1509, 2011.

QUINÁIA, S. P.; NÓBREGA, J. A. Determinação Direta de Crômio em Açúcar e Leite por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 185-190, 2000.

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

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

RIBEIRO, A. S.; ARRUDA, M. A. Z.; CADORE, S. Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Filamento de Tungstênio. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 396-405, 2002.

RIMM, E. B. Fruit and Vegetables - Building a Solid Foundation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 1-2, 2002.

ROCHA, D. L.; BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R. P.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. Greening Sample Preparation in Inorganic Analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 79-92, 2013.

SANTOS, H. M.; CAPELO, J. L. Trends in Ultrasonic-Based Equipment for Analytical Sample Treatment. **Talanta**, v. 73, p. 795-802, 2007.

SANTOS, W. N. L.; BRANDÃO, G. C.; PORTUGAL, L. A.; DAVID, J. M.; FERREIRA, S. L. C. A photo-oxidation procedure using UV radiation/H₂O₂ for decomposition of wine samples — Determination of iron and manganese content by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 601-604, 2009.

SARDANS, J.; MONTES, F.; PEÑUELAS, J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in Biological Samples by Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 65, n. 2, p. 97-112, 2010.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. **Como Iniciar a Validação de Métodos Analíticos**. ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo (REMESP). 30 de maio a 01 de junho de 2006, São Paulo, Brasil.

SILVA, F. C.; AZEREDO CÉSAR, M. A.; SILVA, C. A. B. **Pequenas Indústrias Rurais de Cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo**. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2003. 155 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 9.

SMOLIN, L. A.; GROSVENOR, M. B. **Nutrition: science and applications with bloklet package**. 1 ed. Orlando: John Wiley & Sons Inc, 2007. 864 p.

SOETAN, K. O.; OLAIYA C. O.; OYEWOLE, O. E. The Importance of Mineral Elements for Humans, Domestic Animals and Plants: a review. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5, p. 200-222, 2010.

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

SPEARS, E. E., KASSOUF, A. L. A Segurança dos Alimentos: uma preocupação crescente. **Revista Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 18-19, 1996.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Simple and Fast Sample Preparation Procedure Prior to Multi-element Analysis of Slim Teas by ICP OES. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 10, p. 2051-2063, 2014.

TADEO, J. L.; BRUNETE, C. S.; ALBERO, B.; VALCÁRCEL, A. I. G. Application of Ultrasound-Assisted Extraction to the Determination of Contaminants in Food and Soil Samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2415-2440, 2010.

TAMBOSI, J. L. **Remediação de Efluente da Indústria de Papel e Celulose por Processos Oxidativos Avançados e Coagulação Férrica**. 2005. 131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

TAVARES, T. M., CARVALHO, F. M. Avaliação de Exposição de Populações Humanas a Metais Pesados no Ambiente. Exemplos do Recôncavo Baiano. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

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

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.

UNICA – **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo**. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/>> Acesso em: 20 nov. 2015.

VANDERCASTELLE, C.; BLOCK, C. B. **Modern Methods for Trace Element Determination**. Chichester e Nova York: John Wiley & Sons, 1993. p. 93.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; SILVA, T. G. E. R.; BORGES, M. T. M. R.; LOPES, C. H. DELIZA, R. Avaliação Sensorial de Açúcar Mascavo. **Brazilian Journal of Food Technology**, 6º SENSIBER, p. 29-38, 19-21 de ago. 2010.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3 ed. Alemanha: Wiley - VCH, 1999. 941 p.

WERNIMONT, G. T. **Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods**. 1 ed. Virginia: AOAC International, 1985. 183 p.

WILWERTH, M. W.; SILVA, C. V. N.; SOUZA, G. B. de; BERNARD, A. C. de; LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. **Determinação de Minerais e Metais Pesados em Açúcar Mascavo**. 8ª Jornada Científica e Tecnológica da UFSCar. São Carlos: 5-9 de out. 2009.