

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

IRINEO KELTE FILHO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DE Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn POR FAAS EM FARINHAS DE  
MILHO PRODUZIDAS NO ESTADO DO PARANÁ

GUARAPUAVA

2016

IRINEO KELTE FILHO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DE Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn POR FAAS EM FARINHAS DE  
MILHO PRODUZIDAS NO ESTADO DO PARANÁ

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

GUARAPUAVA

2016

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus pelo dom da vida, por estar sempre ao meu lado, me abençoando com dádivas que recebi ao longo da minha existência, colocando pessoas maravilhosas em minha caminhada e permitindo que eu estivesse hoje aqui realizando esse sonho.

Aos meus pais, as pessoas que mais amo nessa terra, por terem cuidado de mim, me criado, me amado, me ensinado valores que carregarei por toda minha vida e me tornaram o homem que sou hoje. Agradeço também por todo o incentivo e apoio que recebi para estar nessa carreira acadêmica. Isto não seria possível sem vocês.

Aos meus irmãos Natali e Ludovico, por cada vez que mostraram o significado da palavra família, vivendo fraternalmente, muito obrigado pelo apoio demonstrado diariamente, me "suportando" em momentos difíceis.

Aos meus avós Ludovico (*in memoriam*) e Flora (*in memoriam*), com quem convivi toda minha infância e tive muitas aprendizagens, estarão sempre em minhas lembranças e em meu coração.

Ao meu tio Iranor (*in memoriam*), por todas as conversas que tivemos, sempre me incentivando a buscar o conhecimento através da ciência e a fazer o bem aos outros, sempre sendo bem humorado, alegrando a todos.

À minha tia Leoni e às minhas primas Liliane e Heloisa, por terem me acolhido nesta cidade durante vários anos de meus estudos, sem os quais o Mestrado não seria possível, muito obrigado pela acolhida, serei eternamente grato.

À todos os familiares que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial, terão minha gratidão.

À minha namorada Helen, pelo amor, companheirismo e paciência que dedicou a mim durante todo esse período, fazendo parte e compartilhando dos meus sonhos.

Aos amigos e colegas do laboratório LabGati, Fernanda, Luciane, Chalder, Leonardo, Ericka e um especial agradecimento às minhas amigas Mariane e Flávia, por me ajudarem inúmeras vezes e serem amigas tão leais, estando sempre ao meu lado quando precisei.

Às minhas amigas Ana Caroline Jaski, Joseane e Massayumi, por todas as vezes que me auxiliaram no laboratório, sendo sempre muito dedicadas e atenciosas.

Agradeço a todos do Ministério Universidades Renovadas (MUR) e do GOU Seu Amor é Demais (SAD), meus amigos que me ajudaram nessa caminhada, onde através da fé nos tornamos irmãos.

Agradeço também a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Química pelos ensinamentos, orientações e sugestões.

Um agradecimento especial à minha orientadora Dra. Sueli Pércio Quináia, por toda sua paciência, zelo e dedicação durante todos esses anos em que me orientou. Muito obrigado pela oportunidade de realizar esta pesquisa sob sua orientação. Levarei para sempre todos os aprendizados e conselhos que recebi.

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

À UNICENTRO e ao Programa de Pós-graduação em Química.

Finalmente, a todas as pessoas que de alguma forma me incentivaram e ajudaram para que a realização deste projeto fosse possível.

*"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas?"*

*Isaac Newton*

*"Na fé ecoa o eterno presente de Deus, que transcende o tempo, mas que só pode ser acolhida no nosso hoje, que não torna a repetir-se".*

*Bento XVI*

*"O homem há de voar".*

*Santos Dumont*

## RESUMO

O milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais produzidos no Brasil, sendo o Estado do Paraná o maior produtor do país. Além de ser um alimento nutritivo, é utilizado tanto no consumo animal como na alimentação humana, seja na forma *in natura* ou de canjicas ou farinhas. A farinha de milho está presente na preparação de diversos pratos brasileiros e é muito consumida devido ao seu valor acessível. Apesar disso, não são encontradas muitas referências bibliográficas sobre a composição mineral da farinha de milho. No Brasil, o método oficial utilizado para o preparo e determinação de metais é descrito pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists), sendo a digestão feita por via seca, através da calcinação das amostras a altas temperaturas, o que pode causar perda de analito por volatilização, além de ser um processo demorado e dispendioso. Desta forma, torna-se necessário a busca por metodologias analíticas rápidas e de menor custo para a determinação de íons metálicos em farinhas de milho. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização e validação de uma metodologia analítica para determinação dos íons metálicos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho produzidas no Estado do Paraná. Neste trabalho, aplicou-se a digestão por via úmida das amostras usando HNO<sub>3</sub>, aquecimento em bloco digestor e solubilização em banho ultrassom. Os testes de validação envolveram estudos de linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão. O tempo de digestão das amostras foi de 1:30 h e as porcentagens de recuperação dos metais foram de 93 % para Ca, 98 % para Cu, 110 % para Fe, 97 % para Mg, 101 % para Mn e 106 % para Zn. Na sequência, determinou-se as concentrações de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em 23 amostras de farinha de milho amarela e 11 amostras de farinha branca. As médias das concentrações determinadas para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas farinhas amarelas foram de 51,04; 0,49; 8,05; 81,45; 1,38 e 1,92 mg/kg, respectivamente e de 64,44; 0,57; 7,35; 98,44; 1,31 e 2,74 mg/kg nas farinhas brancas, respectivamente. Uma Análise de Componentes Principais (ACP) sugeriu que pode existir uma correlação entre os teores de minerais e os locais de origem das farinhas. Avaliou-se também a contribuição mineral proveniente da ingestão da farinha segundo os critérios de IDR (Ingestão Diária Recomendada).

**Palavras-chave:** *farinha de milho, digestão ácida, validação de método, determinação de íons metálicos, espectrometria de absorção atômica em chama.*

## ABSTRACT

Corn (*Zea mays*) is one of the most produced cereals in Brazil, being the State of Paraná the largest producer in the country. In addition to being a nutritious food, it is used in both, animal consumption and human consumption, in the in natura form or of “canjicas” or flours form. Corn flour is present in the preparation of several Brazilian dishes and it is highly consumed due to its affordable value. Despite of this, not many bibliographical references about the mineral composition of corn flour are found. In Brazil, the official method used for the preparation and determination of metals is described by the AOAC (Association of Official Analytical Chemists), the digestion being done by the dry ashing process, through the calcination of the samples at high temperatures, which can cause loss of analyte by volatilization, in addition to being a time-consuming and expensive process. Thus, it is necessary to search fast and cost-effective analytical methodologies for the determination of metal ions in corn flours. The objective of this work was to develop, optimize and validate an analytical methodology for the determination of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn metal ions in samples of corn flour produced in the State of Paraná. In this work, the wet digestion of the samples was applied using HNO<sub>3</sub>, heating in a digester block and solubilization in an ultrasonic bath. The validation tests involved studies of linearity and working range, detection and quantification limits, accuracy and precision. The samples were digested with recuperation rates of 93% for Ca, 98% for Cu, 110% for Fe, 97% for Mg, 101% for Mn and 106% for Zn. Concentrations of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn were determined in 23 samples of yellow corn flour and 11 samples of white flour. The averages of the concentrations determined for Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn in the yellow flours were 51.04; 0.49; 8.05; 81.45; 1.38 and 1.92 mg / kg, respectively, and 64.44; 0.57; 7.35; 98.44; 1.31 and 2.74 mg / kg in white flour, respectively. A Principal Component Analysis (PCA) suggested may be a correlation between the mineral contents and the places of origin of the flours. It was also evaluated the mineral contribution coming from the ingestion of the flour according to the criteria of RDI (Recommended Daily Intake).

**Key words:** *Corn flour, acid digestion, method validation, metal ion determination, flame atomic absorption spectrometry.*

## Sumário

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Sumário</b> .....	vi
<b>Lista de Tabelas</b> .....	viii
<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Listas de Abreviaturas e Siglas</b> .....	xi
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	4
3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E COMPOSIÇÃO DO MILHO.....	4
3.2. FARINHA DE MILHO.....	6
3.3. MINERAIS E SUA IMPORTÂNCIA NO ORGANISMO.....	7
3.3.1. Cálcio.....	7
3.3.2. Cobre.....	8
3.3.3. Ferro.....	8
3.3.4. Magnésio.....	9
3.3.5. Manganês.....	9
3.3.6. Zinco.....	10
3.4. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA.....	10
3.5. MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	12
3.5.1. Digestão por via seca.....	13
3.5.2. Digestão por via úmida.....	14
3.5.2.1. Digestão por via úmida com microondas.....	15
3.5.2.2. Extração assistida por ultrassom.....	17

3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	19
3.6.1. Linearidade.....	20
3.6.2. Limite de Detecção (LD).....	20
3.6.3. Limite de Quantificação (LQ).....	21
3.6.4. Precisão.....	22
3.6.5. Exatidão.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Equipamentos e reagentes.....	24
4.2. Amostras de farinha de milho.....	25
4.3. Procedimentos para abertura das amostras.....	28
4.3.1. Digestão da farinha em meio ácido usando chapa de aquecimento.....	28
4.3.2. Digestão da farinha em meio ácido usando bloco digestor.....	29
4.4. Validação da metodologia para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho.....	31
4.4.1. Curvas de calibração.....	31
4.4.2. Linearidade.....	32
4.4.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	32
4.4.4. Precisão.....	32
4.4.5. Exatidão.....	33
4.5. Avaliação dos resultados por Análise de Componentes Principais.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Otimização do processo de digestão.....	35
5.2. Validação do procedimento.....	38
5.2.1. Linearidade.....	38
5.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	39
5.2.3. Exatidão.....	40
5.2.4. Precisão e repetitividade.....	41
5.3. Determinação de íons metálicos em amostras de farinha de milho.....	43
5.4. Avaliação de contribuição nutricional.....	51
5.5. Análise de Componentes Principais.....	52
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação taxonômica do milho.....	5
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros instrumentais do FAAS.....	24
<b>Tabela 3:</b> Amostras de farinha de milho amarela e branca e suas regiões de origem.....	25
<b>Tabela 4:</b> Recuperação de íons metálicos ( 1 mg/L ) em farinha de milho após processos de digestão distintos, n=3.....	35
<b>Tabela 5:</b> Procedimentos de digestão por via úmida para amostras de farinhas e derivados de milho.....	38
<b>Tabela 6:</b> Resultados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança.....	39
<b>Tabela 7:</b> Resultados dos valores de LD e LQ do procedimento 5 para as determinações dos metais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho por FAAS.....	40
<b>Tabela 8:</b> Resultados da porcentagem recuperada para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostra de farinha de milho nos níveis de 0,5 e 1,0 mg/L utilizando o procedimento 5.....	41
<b>Tabela 9:</b> Valores de RSD para a repetitividade para determinação de Ca, Cu Fe, Mg, Mn e Zn em amostra de farinha de milho no mesmo dia utilizando o procedimento 5.....	42
<b>Tabela 10:</b> Os resultados das médias das concentrações e do RSD para Ca, Cu, Fe, Mg Mn e Zn em amostra de farinha de milho em 3 dias diferentes.....	43
<b>Tabela 11:</b> Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho amarela utilizando o procedimento 5; n=3.....	44
<b>Tabela 12:</b> Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho branca utilizando o procedimento 5; n=3.....	46
<b>Tabela 13:</b> Aplicação do <i>teste-t</i> para diferenças significativas entre as concentrações de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em farinhas amarela e branca.....	49
<b>Tabela 14:</b> Comparação entre os valores de referência (TACO, 2011) de metais e os obtidos em farinha de milho amarela em mg para cada 100 g.....	51
<b>Tabela 15:</b> Cálculo da contribuição à Ingestão Diária Recomendada a partir do consumo das farinhas de milho amarela e branca produzidas do Estado do Paraná considerando um consumo diário de 100 g.....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Componentes de um espectrômetro de absorção atômica com chama (Fonte: adaptado de SKOOG et al., 2010).....	11
<b>Figura 2:</b> Fotografia de forno mufla para digestão por via seca (Fonte: Google Imagens).....	13
<b>Figura 3:</b> Fotografia de chapa de aquecimento (Fonte: Google Imagens).....	15
<b>Figura 4:</b> Fotografia de bloco digestor (Fonte: Google Imagens).....	15
<b>Figura 5:</b> Fotografia de um digestor por microondas marca MARS (Fonte: Google Imagens).....	17
<b>Figura 6:</b> Processo de cavitação por ultrassom (Fonte: adaptado de SANTOS et al., 2009).....	18
<b>Figura 7:</b> Fotografia de um equipamento para banho de ultrassom (Fonte: Google Imagens).....	19
<b>Figura 8:</b> Localização dos municípios de origem das amostras de farinha.....	27
<b>Figura 9:</b> Procedimento 1. Método de digestão da farinha de milho usando tubo criogênico e chapa de aquecimento.....	28
<b>Figura 10:</b> Procedimento 2. Método de digestão de farinha de milho usando tubo Falcon (50 mL) e chapa de aquecimento.....	29
<b>Figura 11:</b> Procedimento 3. Método de digestão da farinha de milho usando tubo Falcon (15 mL) e chapa de aquecimento.....	29
<b>Figura 12:</b> Procedimento 4. Método de digestão da farinha de milho usando tubos de vidro (10 mL) e bloco digestor (120°C).....	30
<b>Figura 13:</b> Procedimento 5. Método de digestão da farinha de milho usando tubos de vidro (10 mL) e bloco digestor com rampa de aquecimento.....	30
<b>Figura 14:</b> Procedimento 6. Método de digestão da farinha de milho usando tubos de vidro (10 mL) e bloco digestor (150°C).....	31
<b>Figura 15:</b> Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho amarela utilizando o procedimento 5.....	47
<b>Figura 16:</b> Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho branca utilizando o procedimento 5.....	48
<b>Figura 17:</b> Gráfico das variáveis Ca, Fe, Mg, Mn, Cu e Zn na ACP.....	53

<b>Figura 18:</b> Gráfico das amostras de farinhas de milho apontando os locais de produção..	54
<b>Figura 19:</b> Gráfico das amostras de farinhas de milho apontando as farinhas brancas e amarelas na ACP.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABIMILHO** - Associação Brasileira das Indústrias do Milho

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AOAC** - Association of Official Analytical Chemists

**ACP** - Análise de Componentes Principais

**CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento

**EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**FAAS** - Flame Atomic Absorption Spectroscopy

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**ICH** - International Conference on Harmonisation

**IDR** - Ingestão Diária Recomendada

**LD** - Limite de Detecção

**LQ** - Limite de Quantificação

**NATA** - National Association of Testing Authorities

**ICP-OES** - Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy

**ICP-MS** - Inductively coupled plasma mass spectrometry

**RDC** - Resolução de Diretoria Colegiada

**RSD** - Desvio Padrão Relativo (do inglês *Relative Standard Deviation*)

## 1. INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no planeta, sendo o segundo cereal mais cultivado no Brasil (SCHWANZ et al., 2012). De acordo com a CONAB (2015), a produção de milho no Brasil em 2015 foi de 54,5 milhões de toneladas, com colheitas elevadas provenientes de agricultores da região centro-sul do país. O Estado do Paraná é responsável por cerca de 24 % do total de milho produzido no Brasil, sendo o maior produtor de milho do país (EMBRAPA, 2010).

O milho é um alimento muito energético, possuindo em sua composição vitaminas A e do complexo B, proteínas, gorduras, carboidratos, Ca, Fe, P e amido (ABIMILHO, 2015). Por ser muito nutritivo, o beneficiamento do milho fornece vários derivados que são utilizados tanto na alimentação humana como na animal. Um desses produtos é a farinha de milho, que tem a capacidade de suprir as necessidades nutricionais do ser humano, sendo um excelente complemento alimentar, "in natura" ou em forma de farinha de milho, fubá, canjica e outras (ABIMILHO, 2015). Apesar da fração de milho destinada a alimentação humana ser menor, a farinha do milho é muito utilizada na culinária brasileira, na preparação de bolos, pães, biscoitos e outros assados (BASTOS, 1987). Segundo a ANVISA (1978): "farinha é o produto obtido pela moagem da parte comestível de vegetais, podendo sofrer previamente processos tecnológicos adequados".

A composição mineral em grãos de milho pode variar em função da espécie (branco, amarelo, transgênico) e do ambiente de cultivo (solo, clima) (ABIMILHO, 2013/2014) (EMBRAPA, 2010). Minerais são compostos inorgânicos contendo nutrientes, sendo carregados positivamente ou negativamente. Os nutrientes minerais são elementos remanescentes após os alimentos serem completamente queimados a cinzas (GREENE, 2000). Apesar da Resolução RDC 344, de 13 de dezembro de 2002, que instituiu que as farinhas de trigo e milho deveriam ser enriquecidas com ácido fólico e ferro, as farinhas de milho avaliadas neste trabalho são do tipo biju e floção, que segundo a mesma resolução, são isentas de enriquecimento (ANVISA, 2002).

Devido a crescente demanda do mercado pelo milho e seus produtos, e a preocupação com o desenvolvimento de alimentos de melhor qualidade, é importante avaliar a composição de íons metálicos essenciais nesses alimentos. Apesar de existirem pesquisas sobre a composição do grão de milho, principalmente em relação à análise de

metais traço, no Brasil há escassez de pesquisas sobre a concentração de íons metálicos em farinhas de milho, tornando-se necessário investigar a composição mineral nas mesmas.

A quantificação de nutrientes inorgânicos em alimentos normalmente é realizada por métodos baseados em espectroscopia atômica (absorção atômica com chama - FAAS ou emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado - ICP OES). Atualmente, o método oficial utilizado para o preparo de produtos farináceos, na determinação de metais, envolve a digestão total da amostra por via seca, a partir das cinzas remanescentes (AOAC, 1997). Geralmente, o método é dispendioso e demorado, o que resulta em grande gasto de energia, tempo e reagentes. O longo tempo de preparo de amostras alimentícias utilizando a calcinação e o controle inadequado da temperatura podem proporcionar a contaminação das amostras ou até mesmo a perda de elementos por volatilização, inviabilizando demandas elevadas de análises químicas. Com isso, encontram-se na literatura vários artigos apresentando a opção da digestão dos alimentos por via úmida em ambientes fechados utilizando forno microondas. Apesar destas técnicas apresentarem eficiência e agilidade analítica, nem todo laboratório químico ou de alimentos está equipado para a prática deste tipo de digestão. Portanto, métodos convencionais de digestão por via úmida, na presença de ácidos e oxidantes, usando técnicas de aquecimento de menor custo, como chapas de aquecimento ou blocos de digestão continuam sendo investigados.

Nesta pesquisa, foi desenvolvido e validado um procedimento de digestão por via úmida de amostras de farinha de milho dos tipos biju e floção, com o objetivo de reduzir o tempo de preparo e consumo de reagentes em comparação a outras metodologias. Além disso, foi quantificada a concentração de alguns nutrientes minerais em amostras de farinha de milho (amarela e branca) produzidas no Estado do Paraná, especificadamente na determinação de Ca, Cu, Fe, Mn, Mg e Zn utilizando a FAAS. Também foi realizada a caracterização do perfil mineral de amostras de farinhas de milho adquiridas em diferentes regiões produtoras no Estado do Paraná.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Otimizar e validar um método analítico relativamente rápido e simples para a preparação de amostras de farinha de milho por via úmida visando à determinação de nutrientes inorgânicos (Ca, Cu, Fe, Mn, Mg e Zn) por FAAS.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Otimizar um procedimento de digestão de amostras, por via úmida, para a completa eliminação de matéria orgânica em farinhas de milho;
- Realizar a validação do método de digestão otimizado através dos parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão;
- Determinar a concentração de Ca, Cu, Fe, Mn, Mg e Zn em amostras de farinha de milho (amarela e branca) utilizando o procedimento otimizado e validado por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS);
- Avaliar a contribuição nutricional, em relação aos íons metálicos, da farinha de milho em função da ingestão diária recomendada;
- Utilizar ferramentas estatísticas multivariadas para verificar possíveis correlações entre as concentrações dos íons metálicos determinados nas amostras e sua região de origem.

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E COMPOSIÇÃO DO MILHO.**

O milho (*Zea mays*) é um alimento que era consumido pelos povos que habitavam a América desde o ano 5 mil a.C., o que o tornou um alimento importante para várias civilizações da antiguidade, como os Maias, Astecas e Incas, que possuíam uma reverência com o cereal na arte e religião de seus povos. Com a descoberta da América, o cultivo do milho se difundiu para outras regiões do planeta, sendo atualmente um dos cereais mais cultivados, perdendo apenas para a produção de trigo e arroz (ABIMILHO, 2016).

O milho é cultivado em todo o Brasil, tendo grande importância econômica, devido às diversas formas de sua utilização, desde a alimentação humana e animal e na produção de bio-combustíveis (FORNASIERI FILHO, 2007). No Brasil, é o principal cereal produzido, sendo cultivado em cerca de 14,4 milhões de hectares, com uma produtividade média de 4 toneladas por hectare (IBGE, 2009), sendo hoje a cultura mais utilizada na rotação com a soja (DUARTE, 2002). Atualmente, devido ao avanço nas pesquisas, o cultivo do milho é possível desde a Linha do Equador até o limite das terras temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3.600 m. Essa fácil adaptabilidade, representada por variados genótipos, é paralela à variedade de sua utilização como alimento, forragem ou na indústria (EMBRAPA, 2002).

O milho é uma planta pertencente à família *Gramineae/Poaceae*, possuindo caráter monóico e morfologia característica que resultaram da supressão, condensação e multiplicação de diversas partes da anatomia básica das gramíneas, o que resultou em uma planta anual, robusta e ereta, com um a quatro metros de altura, que é notadamente desenvolvida para a produção de grãos (EMBRAPA, 2002).

Hoje são encontradas cerca de 150 espécies de milho, com grande diversidade de cor e formato dos grãos. É fácil de ser plantado e colhido, independente da sua variedade (ABIMILHO, 2013/2014).

O milho é uma das plantas que mais armazenam energia na natureza. De uma semente que pesa pouco mais de 0,3 g irá surgir uma planta geralmente com mais de 2,0 m de altura, produzindo cerca de 600 a 1.000 sementes similares àquela da qual se originou (ALDRICH et al., 1982). Seus grãos são geralmente amarelos ou brancos, apresentando

cores que variam desde o preto até o vermelho. Dentre os cereais, é o que possui maior grão, com o peso individual variando de 250 a 300 mg (PAES, 2008). A Tabela 1 apresenta a classificação taxonômica do milho.

**Tabela 1:** Classificação taxonômica do milho

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Filo</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Liliopsida</i>
<b>Ordem</b>	<i>Poales</i>
<b>Família</b>	<i>Poaceae</i>
<b>Gênero</b>	<i>Zea</i>
<b>Nome Comum</b>	Milho

Fonte: NATURDATA, 2016

A composição do grão do milho em base seca é de 61 a 78 % de amido, 6 a 12 % proteínas, 2 a 4 % fibra, 3 a 6 % de óleo e 1 a 4 % minerais, distribuídos de forma diferente entre as quatro estruturas físicas do grão: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (PAES, 2008).

As cascas dos grãos de milho são abundantes em fibras, sendo fundamental para que ocorra a eliminação de toxinas do organismo humano. De acordo com a ABIMILHO (2016): "cada 100 gramas do alimento tem cerca de 360 Kcal, sendo 70 % de glicídios, 10 % de protídeos e 4,5 % de lipídios" (ABIMILHO, 2016).

O endosperma do milho possui cerca de 83 % do peso seco do grão, concentrando 75 % da proteína e 98% do total de carboidratos, dos quais 86 a 89 % é amido. Já o gérmen representa de 10 a 14 % do peso do grão, contendo aproximadamente 26 % da proteína, 83 % dos lipídeos e quase a totalidade das vitaminas, minerais e açúcares do grão. O pericarpo, cujo peso corresponde de 5 a 6 % do peso do grão, concentra cerca de 55 % das fibras do grão do milho. A menor parte do milho é a ponta, correspondendo a apenas 0,8 % do peso do grão, entretanto esta região concentra cerca de 7 % das fibras do grão (PAES, 2008).

### 3.2. FARINHA DE MILHO

Como a farinha de milho apresenta sabor peculiar, é um produto consumido por todas as classes sociais no Brasil, sendo a base energética de muitos pratos típicos dos brasileiros. Além disso, como possui um preço atrativo, a farinha de milho é um alimento altamente consumido pela classe de baixa renda brasileira (ABIMILHO, 2002).

Apesar de o Brasil ser um grande produtor, os derivados de milho tiveram seu consumo restringido a partir de 1950 devido ao subsídio dado aos produtos de trigo (BASTOS, 1987). Recentemente, com a retirada deste subsídio, o consumo de produtos derivados do milho tornou-se mais atrativo devido ao baixo custo e elevado valor energético (CALLEGARO et al., 2005). Nos dias atuais, embora o consumo do milho e seus derivados esteja crescendo no Brasil, ainda possui um consumo bem menor em relação a alguns países como o México e aos da região do Caribe, que tem o milho na base de sua alimentação (ABIMILHO, 2016).

A farinha de milho possui a capacidade de suprir as exigências nutricionais da alimentação humana, atuando como um bom complemento alimentar, seja "*in natura*" ou em forma de farinha de milho, fubá, canjica e outros derivados alimentícios (ABIMILHO, 2015).

A produção da farinha de milho bijú ou floção ocorre principalmente em indústrias alimentícias de pequeno porte, tendo o processo de produção dividido em quatro etapas: canjicamento, umidificação, moagem e peneiragem e torra, como explicitado abaixo segundo ALESSI (2003).

Primeiramente, no processo de produção da farinha de milho, durante o canjicamento, o milho é colocado em uma máquina na qual facas de metal retiram as películas e o gérmen do milho, deixando somente a canjica. Na etapa de umidificação, essa canjica limpa é depositada em tanques com água, na qual permanece em torno de cinco dias. Após esse período, durante a etapa de moagem e peneiragem, a canjica umedecida passa por um moinho de aço, que transforma a canjica em uma espécie de massa fina úmida, que é depositada sobre um forno giratório formado por chapas de metal que está em alta temperatura (cerca de 300 °C). Nesse forno ocorre a torra, onde rolos de teflon compactam a massa, que fica com a aparência de biju ou floção, dependendo da farinha que se deseja obter. Após passar pelo forno, a farinha de milho é pesada e embalada. Como

neste processo há contato da farinha com equipamentos de metal, é possível que ocorra alguma contaminação (ALESSI et al., 2003).

É comum encontrar na literatura artigos envolvendo a determinação de parâmetros nutricionais da farinha de milho como umidade, proteínas, lipídeos, fibras, cinzas e carboidratos ou ainda a determinação de Fe em produtos enriquecidos (BOEN et al, 2007; GIACOMELLI et al., 2012). No entanto, a determinação de metais em amostras de farinhas de milho não são comuns. SANTOS et al. (2004), elaboraram uma pesquisa sobre a concentração de alguns íons metálicos em diversos alimentos, entre eles a farinha de milho, comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Os valores médios determinados dos metais Al, Cu, Mn, Zn, Cd, Cr, Ni e Pb nas farinhas foram de 5,7; 1,0; 3,1; 9,0; 0,8; 18,0; 42,0 e 3,0 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. FATOKI (1990), depreveu baixas concentrações de Na (0,3 - 0,4 mg g<sup>-1</sup>), K (0,3 - 0,5 mg g<sup>-1</sup>), Ca (0,2 mg g<sup>-1</sup>) e Mg (0,2 - 0,3 mg g<sup>-1</sup>) em farinhas de milho produzidas na Nigéria e destinadas ao consumo infantil. ALGÜL e KARA (2014), correlacionaram teores de Cr, Cu e Zn em farinhas de milho provenientes da Turquia com algumas toxinas.

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

Os nutrientes minerais podem ser classificados em macro, secundário e micro ou ainda em minerais-traço. Esta classificação é baseada em sua exigência diária pelo organismo humano, em vez de sua abundância na natureza (GUPTA, 2014).

Os alimentos vegetais contêm quase todos os nutrientes minerais e nutrientes orgânicos essenciais para a nutrição humana. Toda forma viva necessita essencialmente destes nutrientes minerais para os seus processos normais da vida (SOETAN, 2010).

Neste trabalho serão evidenciados os íons metálicos Ca, Cu, Fe, Mn, Mg e Zn, elementos muito importantes para a alimentação humana e que desempenham diversas funções no funcionamento do organismo.

#### **3.3.1. Cálcio**

O Ca é o quinto elemento em abundância em massa na crosta da Terra. É um elemento que está em toda parte do planeta e fornece inúmeros benefícios para a saúde do

corpo humano (STIPANUK e CAUDILL, 2012). O principal benefício do Ca é o importante papel que desempenha no desenvolvimento de ossos fortes e saudáveis.

Quase a totalidade de Ca presente no corpo pode ser encontrada nos ossos e dentes e há inúmeros estudos que demonstram que a ingestão adequada de Ca ajuda os jovens a desenvolver ossos fortes, além de manter os ossos de pessoas mais idosas fortes e saudáveis. O Ca também ajuda a prevenir e tratar uma variedade de doenças ósseas, como por exemplo a osteoporose (STIPANUK e CAUDILL, 2012).

### **3.3.2. Cobre**

O Cu é um mineral essencial para o organismo humano e ao mesmo tempo pode ser tóxico dependendo da quantidade ingerida (ARAYA et al., 2007). O Cu é relacionado com a saúde óssea, função imunológica, risco cardiovascular e alterações no metabolismo do colesterol (ARAYA et al., 2007). A deficiência de Cu leva à diminuição simultânea de Fe em alguns tecidos e anemia por deficiência de Fe. Além disso, pode causar um aumento da concentração de Fe em outros tecidos, como por exemplo intestino e fígado (KUO et al., 2004).

### **3.3.3. Ferro**

O Fe desempenha importantes funções no funcionamento do organismo humano. A anemia por deficiência de Fe é o distúrbio nutricional mais comum em todo o mundo (AKHTER et al., 2005; PAESANO et al., 2010). A anemia pode ser resultado da baixa ingestão, absorção intestinal inadequada, perda de sangue e/ou aumento das necessidades excessivas (AKHTER et al., 2005). Enquanto o excesso de Fe também é responsável por um número de doenças, a quantidade normal de Fe do nosso corpo é geralmente mantida controlando a quantidade de Fe absorvida dos alimentos (AKHTER et al., 2005). A anemia afeta o desenvolvimento físico e cognitivo de crianças, muitas vezes resultando em processos irreversíveis (BEINNER e LAMOUNIER, 2003). O Fe é necessário para a produção de hemoglobina no sangue e mioglobina nos músculos.

Para evitar e combater a deficiência do Fe no organismo deve-se ter uma alimentação baseada em alimentos ricos no mineral que possa ser absorvido pelo corpo humano.

Fontes vegetais que são ricas em Fe incluem espinafre, feijão, ovos, pães fortificados, cereais e farinhas. Os alimentos que fornecem a maior quantidade de Fe incluem cereais enriquecidos, bolos, biscoitos, massas, feijão, lentilha, aves (OHIO STATE UNIVERSITY, 2013), milho e vegetais de folhas verdes (STIPANUK e CAUDILL, 2012).

#### **3.3.4. Magnésio**

O Mg é o quarto mineral mais abundante no corpo e é essencial para a boa saúde. Aproximadamente 50 % do total de Mg do corpo é encontrada no ossos. A outra metade é encontrada predominantemente dentro das células dos tecidos e órgãos do corpo. Apenas 1 % do Mg é encontrado no sangue, mas o corpo trabalha muito para manter esse nível constante (INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE, 2013). Ele desempenha um papel importante no sistema nervoso, na função dos músculos, e para que o organismo tenha ossos fortes (STIPANUK e CAUDILL, 2012). O Mg tem literalmente centenas de funções no corpo humano, e alguns de seus benefícios mais importantes para a saúde incluem a regulação do relaxamento e contração de músculos, a produção de proteínas, e também a produção e transporte de energia ao longo do corpo (STIPANUK e CAUDILL, 2012). Ele também tem um importante papel a desempenhar na redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares. Em um estudo recente, pesquisadores descobriram que indivíduos que bebiam água deficiente em Mg foram mais propensos a desenvolver doenças cardiovasculares (STIPANUK e CAUDILL, 2012). O Mg também desempenha um papel no ataque de doenças crônicas, tais como a arteriosclerose, diabetes, obesidade, síndrome metabólica, e hipertensão (BAE e CHOI, 2011).

#### **3.3.5. Manganês**

O Mn é um metal traço essencial encontrado em todos tecidos, sendo necessário para aminoácidos, lipídios, proteínas, entre outros (ERIKSON et al., 2007). Possui um papel importante nos ossos e cartilagens, além de auxiliar na cicatrização de feridas. O Mn necessário somente em quantidades muito pequenas no corpo humano, sendo que a deficiência de Mn no ser humano raramente foi documentada (STIPANUK e CAUDILL, 2012). O Mn é um elemento essencial para o organismo humano, entretanto, em doses

mais elevadas é um metal tóxico (BORNHORST et al., 2010). Devido à ocorrência de Mn em alimentos, a absorção diária de Mn nos países industrializados é mais elevada do que o requisitado diariamente para o organismo humano.

Apesar de a deficiência de Mn ser extremamente rara, a toxicidade de Mn crônica, que afeta principalmente o sistema nervoso central, é mais prevalente (BORNHORST et al., 2010).

### **3.3.6. Zinco**

O Zn apresenta diversas funções no metabolismo do corpo humano. Além de ser essencial para a cicatrização de feridas, é necessário para a atividade metabólica de cerca de 300 enzimas do corpo, sendo considerado essencial para a divisão celular e para síntese de DNA e proteína (LIFE EXTENSION FOUNDATION, 2013). Populações que se alimentam em sua maioria de alimentos vegetais são mais propensas a estar com deficiência de minerais, incluindo a de Zn (TUPE e CHIPLONKAR, 2010).

Em um estudo em grande escala, uma associação direta entre risco elevado de câncer de próstata e o consumo de Zn foi encontrado, particularmente para câncer avançado (GALLUS et al., 2007).

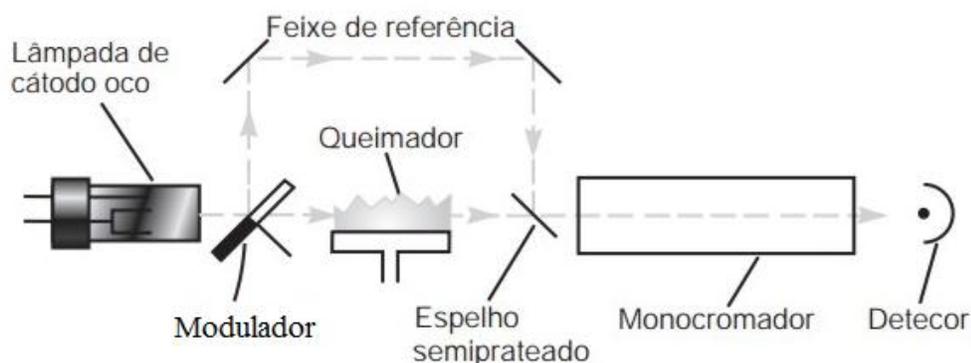
## **3.4. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA**

A espectrometria de absorção atômica têm sido um dos métodos mais utilizados para determinação de metais ao longo dos últimos cinquenta anos nas mais diversas amostras analíticas, se tornando uma técnica de rotina em diversas análises. Nesta técnica é necessário que ocorra a atomização dos elementos que pretendem ser determinados. A técnica que utiliza a chama como atomizador dos analitos é chamada de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, mais conhecida como FAAS (do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometric*) (SKOOG et al., 2006).

Para que ocorra a atomização do analito na chama, a amostra em solução deve ser nebulizada, misturada com um combustível no estado gasoso e arrastada para a chama, que é composta por ar/acetileno ou acetileno/óxido nitroso, dependendo do metal que será analisado. Durante esse processo, parte do analito é atomizado e outra parte pode sofrer

ionização ou ainda recombinação com elementos da chama formando moléculas indesejáveis que podem interferir na leitura da amostra, o que torna a atomização a etapa mais importante na espectroscopia com chama, pois é a que define a precisão do método (SKOOG et al, 2006).

Além do atomizador, um espectrômetro de absorção atômica com chama também é composto de outros componentes, tais como: fonte de radiação, modulador de fonte, monocromador e detector, como mostrado na Figura 1 (LAJUNEN e PERAMAKI, 2004).



**Figura 1:** Componentes de um espectrômetro de absorção atômica com chama (Fonte: adaptado de SKOOG et al., 2006)

A fonte de radiação mais utilizada para o FAAS é a lâmpada de cátodo oco, na qual um ânodo de tungstênio e um cátodo fechado em um tubo de vidro é preenchido com neônio ou argônio. O cátodo é feito com o metal que se deseja analisar. Após a aplicação de uma corrente, os cátions no estado gasoso conseguem energia necessária para retirar alguns átomos metálicos da superfície do cátodo, os quais estão excitados e emitem sua radiação, que é específica de cada metal, ao retornarem ao estado fundamental (SKOOG et al., 2006).

O modulador de fonte tem a função de eliminar ou reduzir interferências geradas pela chama durante a análise, mesmo que muitas dessas interferências sejam reduzidas pelo monocromador. No FAAS é utilizado atomizador de chama, que é composto por um queimador de fluxo laminar e uma câmara nebulizadora, onde ocorre a mistura prévia do aerossol composto pelo analito, por um composto oxidante e pelo combustível, que segue para queima na chama no queimador (SKOOG et al., 2006; LAJUNEN e PERAMAKI, 2004).

O monocromador é utilizado na espectrometria de absorção atômica com chama para diminuir a banda espectroscópica de determinado metal, a fim de diminuir possíveis interferências que outras linhas possam causar. Já o detector mais comum utilizado no FAAS é o fotomultiplicador, que é composto de sistemas que conseguem distinguir entre o sinal da fonte e o sinal da chama. Além disso, os fotomultiplicadores são extremamente sensíveis (SKOOG et al., 2006).

### **3.5. MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS**

A etapa de preparo de amostras constitui uma das etapas mais importantes durante a determinação de metais em amostras complexas. Os procedimentos empregados no processo de preparo dependem muito da natureza da amostra e da concentração dos elementos a serem determinados. Outro fator importante a ser considerado na escolha da decomposição de uma amostra é o tipo de técnica que será empregada para a quantificação dos analitos. Técnicas de decomposição de amostras por via seca, ou seja, por calcinação, apresentam uma série de inconvenientes, como risco de contaminação, perda dos analitos voláteis e elevado tempo gasto para a eliminação da matéria orgânica, deixando o processo tedioso. Com isso, procedimentos que diminuam o tempo de preparo e permitam a análise de um número maior de amostras é interessante (CHRISTIAN, 1994 e VANDECASTEELE e BLOCK, 1993).

No processo de determinação de metais por FAAS, a amostra deve estar solubilizada para ser analisada, por isso o método de preparo de amostra é uma etapa importante, que influencia na precisão e na exatidão da técnica. No entanto, não existe uma técnica de preparo de amostra que seja universal, isto é, dependendo do tipo de matriz a ser analisada, é necessário que o método de preparo seja otimizado. Uma das técnicas mais antigas e utilizadas no preparo de amostras é a digestão em sistemas abertos, nos quais as amostras se encontram em recipientes que contêm aberturas que possibilitem o contato com o ar atmosférico. Entretanto, a digestão de amostras também pode ser realizada utilizando sistemas fechados, ou seja, sistemas nos quais o recipiente que contém a amostra se encontra fechado, não possuindo contato direto com o ambiente atmosférico, minimizando assim a perda de compostos voláteis (VANDECASTEELE e BLOCK, 1993).

### 3.5.1. Digestão por via seca

O procedimento de digestão por via seca é chamado de calcinação a seco, na qual é realizada a queima de materiais orgânicos presentes na amostra até que permaneçam somente compostos inorgânicos nas cinzas. Neste procedimento, são utilizadas temperaturas relativamente altas, que vão de 450 a 550 ° C, onde as amostras são queimadas em cápsulas de porcelana inseridas em forno mufla (Figura 2). A técnica é interessante pois permite empregar quantidades grandes de amostras durante a queima para posterior solubilização e diluição das cinzas restantes em um volume pequeno de água facilitando a determinação de elementos presentes em baixas concentrações. No entanto, como as temperaturas são altas, pode ocorrer volatilização e perda de analito, o que é uma desvantagem desta técnica. Outros problemas enfrentados pelo método são a necessidade de muito tempo para a queima de alguns materiais e o elevado gasto de energia elétrica. Entretanto, várias amostras podem ser calcinadas simultaneamente (HOENIG e KERSABIEC, 1996).



**Figura 2:** Fotografia de forno mufla para digestão por via seca (Fonte: Google Imagens)

Amostras biológicas como tecidos animais ou plantas possuem muitos compostos orgânicos que necessitam ser decompostos durante o processo de digestão por via seca, para isso, é utilizado forno mufla, que atinge altas temperaturas que decompõem a matéria orgânica, restando apenas os minerais (CHRISTIAN, 1994).

Utilizando digestão via seca, CIOBANU et al. (2013), determinaram Cd e Pb em vários alimentos comercializados em Nabertherm, na Alemanha, incluindo farinhas de trigo e milho. O procedimento utilizado no preparo das amostras consistiu da secagem de 20 a 30 g de cada amostra a 105 °C durante uma noite. Após, as amostras foram calcinadas a 450 °C em forno mufla. O resíduo da calcinação foi tratado com 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e mantido em banho de areia a 150 °C, a fim de dissolver as cinzas restantes. Também FATOKI (1990), calcinou amostras de farinha de milho destinada a alimentação infantil a 450 °C durante 16 h com posterior determinação de Na, K, Ca e Mg.

SANTOS et al. (2004), realizaram a calcinação de amostras alimentícias (vegetais, frutas, raízes, grãos, cereais, açúcar, café, farinha de mandioca, farinha de trigo, farinha de milho, massas, carne, peixe, leite) em forno mufla a 400 °C por 24 h para a determinação de Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, U e Zn.

### **3.5.2. Digestão por via úmida**

Na digestão via úmida, as amostras são digeridas através da reação com ácidos ou bases, com ou sem aquecimento. Para o aquecimento da amostra, podem ser utilizadas chapas de aquecimento (Figura 3) ou bloco digestor (Figura 4). Nas chapas de aquecimentos, as amostras podem ser colocadas em banho de areia ou banho-maria, entretanto um aquecimento mais homogêneo pode ser alcançado utilizando o bloco digestor. Atualmente, a digestão por via úmida é bastante utilizada na preparação de amostras. Neste tipo de digestão a temperatura utilizada geralmente é mais baixa em comparação a usada na digestão via seca (abaixo do ponto de ebulição dos oxidantes utilizados). Apesar de a maioria dos métodos de digestão via úmida utilizarem uma combinação de ácidos, o ácido nítrico é o mais citado devido ao fato de ser facilmente encontrado comercialmente com elevado grau de pureza (HOENIG e KERSABIEC, 1996; VANDECASTEELE e BLOCK, 1993).



**Figura 3:** Fotografia de chapa de aquecimento



**Figura 4:** Fotografia de bloco digestor

No processo de digestão via úmida, os agentes oxidantes possuem o papel de destruir a matéria orgânica, por isso não são necessárias temperaturas tão altas como na digestão via seca. O ácido nítrico destrói a matéria orgânica presente na amostra sem decompor os metais traços contidos no analito e como o mesmo entra em ebulição à 86 °C, a sua remoção é facilitada após a oxidação da matéria orgânica (CHRISTIAN, 1994).

Outros ácidos possuem grande poder oxidante e podem ser utilizados em um processo de digestão de amostra, como por exemplo  $H_2SO_4$  e HF. Entretanto, esses ácidos apresentam algumas desvantagens em relação ao  $HNO_3$ , já que o  $H_2SO_4$  possui uma cinética de reação lenta, o que tornaria o processo de digestão mais demorado, enquanto o HF exige uma grande atenção em seu manuseio, podendo causar graves queimaduras que não são percebidas de imediato (SOUSA et al., 2015).

SANTOS et al. (2015), fizeram um estudo sobre a homogeneidade de amostras de farinha de milho a fim de obter material de referência para assegurar a confiabilidade das medidas para nove elementos. Para este fim, 2,0 g da amostra foram colocados em tubos digestores contendo 2,0 mL de  $HNO_3$  e 1,0 mL de  $H_2O_2$ . A mistura foi aquecida sobre um bloco digestor até a obtenção de uma solução límpida. Após, os analitos foram determinados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

### **3.5.2.1. Digestão por via úmida com microondas**

Microondas são uma radiação eletromagnética de baixa energia, geralmente a frequência utilizada em equipamentos de laboratórios é de 2450 MHz. A utilização de

aparelho de microondas permite uma rápida e eficiente decomposição da matéria orgânica nas mais variadas amostras. Uma das principais vantagens da utilização de microondas é a redução do tempo de dissolução das amostras, de horas para minutos. Além disso, a quantidade de reagentes utilizados pode ser reduzida em comparação a outras formas de digestão. As amostras são colocadas em recipientes fechados (copos de Teflon), o que diminui a perda de analito. Como as amostras permanecem em um sistema fechado, a pressão nos copos é grande e acelera a decomposição da matéria orgânica (CHRISTIAN, 1994; VANDECASTEELE e BLOCK, 1993).

ALGUL e KARA (2014), utilizaram forno microondas na digestão de 0,25 g de farinha de milho produzida na Turquia. Dois ciclos de aquecimento foram usados durante o processo de digestão, totalizando 43 min em uma potência de 1600 W. As amostras foram acondicionadas em vasos de Teflon juntamente com 5 mL de HNO<sub>3</sub> (65 %) e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %). No material digerido determinaram Pb, Cd, Hg, As, Cu, Zn e Cr.

MORGANO et al., (1999) determinaram teores de minerais em sucos de frutas com espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado ICP-OES, utilizando forno microondas. Foram utilizadas 5 mL de suco em cada tubo de digestão, sendo em seguida adicionados 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado.

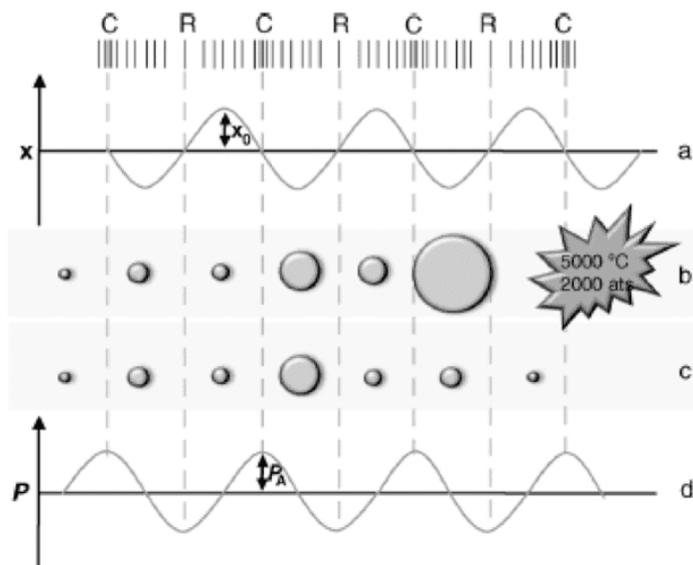
Apesar de ser uma técnica bastante utilizada, nem todos os laboratórios possuem um equipamento de microondas, devido ao seu alto custo. Além do custo, outras limitações são observadas, como a necessidade do uso de massas reduzidas de amostras para evitar aumento de pressão dentro dos frascos de digestão (gases e produtos de decomposição), necessidade de resfriar e despressurizar os frascos de reação durante o programa de aquecimento para cada nova digestão. Na Figura 5 pode-se observar um digestor (marca MARS) que utiliza o sistema microondas para digestão de amostras via úmida.



**Figura 5:** Fotografia de um digestor por microondas marca MARS (Fonte: Google Imagens)

### **3.5.2.2. Extração assistida por ultrassom**

A extração assistida por ultrassom tem sido uma técnica alternativa para a abertura de amostras, pois é um procedimento simples, rápido no qual geralmente não são utilizados reagentes perigosos, sendo utilizada para a extração de íons metálicos em diversas amostras para a determinação do teor de íons metálicos por várias técnicas analíticas. O equipamento de ultrassom emite ondas mecânicas de baixa frequência às quais resultam na cavitação (Figura 6), o que facilita a extração dos elementos minerais da matriz (FREITAS et al., 2015). A formação da cavitação envolve a união de pequenas bolhas ao redor de partículas sólidas, seguido do crescimento e implosão dessas bolhas (BOUDJOUK, 1986).



**Figura 6:** Processo de cavitação por ultrassom (Fonte: adaptado de SANTOS et al., 2009)

Utilizando um procedimento de digestão via úmida assistida por ultrassom, BOEN et al. (2007), avaliaram a concentração de Fe e Zn em farinhas de trigo e milho enriquecidas. As farinhas (~ 0,2 a 0,3 g) foram transferidas para tubos de digestão contendo 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Aos tubos do bloco digestor, adaptaram funis de vidro que auxiliaram no refluxo do vapor ácido. Os tubos foram aquecidos a 100 °C por 2 h, após o resfriamento, adicionou-se 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajustando-se a temperatura para 110 °C por 30 min. Após, a temperatura foi ajustada para 130 °C por mais 1 h. O digerido foi então resfriado, avolumado e colocado em banho de ultrassom por alguns segundos.

FERREIRA et al. (2014) realizaram a determinação dos íons metálicos Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó utilizando FAAS com a extração assistida por ultrassom, sendo que a metodologia proposta mostrou-se simples, rápida e precisa.

Na Figura 7 pode-se observar um equipamento para banho de ultrassom da marca SPENCER (modelo CD-4800) com capacidade para 1400 mL, sendo este o equipamento utilizado neste trabalho.



**Figura 7:** Fotografia de um equipamento para banho de ultrassom (Fonte: Google Imagens)

### **3.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO**

De acordo com VALENTINI et al. (2007), a validação de procedimentos: " é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação de um processo produtivo, de equipamento novo e, inclusive, da metodologia analítica."

A validação de um método analítico incorpora o desenvolvimento, adaptação ou utilização de metodologia conhecida e a realização de um processo que avalie sua eficiência através de alguns parâmetros, entre eles: linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão (ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003). Além disso, o objetivo da validação de determinado método analítico é demonstrar que ele é exato para a utilização a qual é destinado (ICH, 1996).

De acordo com a AVISA (2003), a validação tem a função de garantir que determinado método esteja de acordo com às exigências das aplicações analíticas através de resultados experimentais, para que dessa forma a validação possa assegurar que os dados obtidos em uma análise com método validado sejam confiáveis. Além disso, a validação garante que determinado método analítico apresente resultados reprodutíveis e confiáveis (MATIOLI et al., 2004).

Segundo a UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIV (2000), a validação de métodos analíticos é um processo realizado no laboratório que define quais parâmetros do método cumprem os requisitos necessários para as aplicações de análise confiáveis.

Na sequência serão descritos alguns dos parâmetros de validação mais utilizados em uma otimização analítica, especificadamente: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

### **3.6.1. Linearidade**

A linearidade está diretamente relacionada com a capacidade que um método analítico tem de obter resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito em determinada faixa de análise (BRITO et al., 2003). Geralmente, para o estudo da linearidade é recomendada a utilização de pelo menos de 5 concentrações diferentes do analito de interesse (ICH, 1996).

Após analisar visualmente os gráficos entre a concentração do analito e o parâmetro de medida do equipamento, deve-se observar a existência da relação linear entre os mesmos. Os resultados devem ser tratados por métodos estatísticos específicos que possam determinar alguns fatores, tais como os coeficientes de correlação linear e angular, a intersecção com o eixo Y, além da soma residual da regressão linear e o desvio padrão relativo (RSD %) da análise realizada (ANVISA, 2003). Para que um método apresente linearidade adequada, o coeficiente de correlação linear deve ser igual a um e o coeficiente angular deve ser diferente de zero (BRITO et al., 2003).

### **3.6.2. Limite de Detecção (LD)**

De acordo com o ICH (1996): " O limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e pelo estabelecimento do nível mínimo no qual o analito pode ser detectado de forma confiável." Desta forma, pode-se dizer que o limite de detecção é o menor valor de concentração do analito encontrado em uma amostra que pode ser detectado, mas não automaticamente quantificado, nas condições experimentais realizadas (ANVISA, 2003).

Utilizando os valores de desvio padrão e da inclinação da curva analítica o valor de limite de detecção pode ser calculado através da Equação 1:

$$\text{Equação 1: } LD = 3SD/m$$

Onde:

*SD*: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco

*m*: inclinação da curva de calibração

### **3.6.3. Limite de Quantificação (LQ)**

De acordo com a ANVISA (2003), o limite de quantificação: "é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas". O limite de quantificação é um parâmetro de validação utilizado tanto para ensaios quantitativos de impurezas como para produtos de degradação em fármacos, sendo geralmente expresso em unidades de concentração do analito na amostra analisada (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação é determinado através da análise de amostras com diferentes concentrações de analito, no qual é determinado o menor valor em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitáveis (ICH, 1996).

$$\text{Equação 2: } LQ = 10SD/m$$

Onde:

*SD*: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco

*m*: inclinação da curva de calibração

### **3.6.4. Precisão**

A precisão é a análise da proximidade dos valores obtidos em uma média de várias medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser

avaliada através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

A repetibilidade, também conhecida como precisão intra-corridas é a semelhança entre os resultados obtidos em um período curto de tempo em análises realizadas com o mesmo analista e mesma instrumentação, sendo que a repetibilidade do método deve ser verificada por pelo menos nove determinações (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária (dita como precisão inter-corridas) é expressa pela concordância entre os resultados obtidos em um mesmo laboratório, mas realizados em diferentes dias, com analistas e equipamentos diferentes, no qual o tempo mínimo indicado entre as análises é dois dias de diferença. Já a reprodutibilidade é expressa através da concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes (ANVISA, 2003).

Os valores de repetitividade e precisão intermediária podem ser calculados pelos desvios padrão relativos (RSD %) utilizando a Equação 3 (AOAC, 2012):

$$\text{Equação 3: } \text{RSD} = (s/x) \times 100$$

Em que:

$s$  é o desvio padrão da média das amostras;

$x$  é a média das amostras.

### 3.6.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico apresenta a proximidade de concordância entre um valor teórico ou de referência aceito e o valor encontrado experimentalmente durante a análise. A exatidão pode ser calculada através da adição de padrão com valores de concentração conhecidos e determinados pelo analista. Para se encontrar a exatidão, é calculada a porcentagem que é recuperada da quantidade conhecida do analito que foi adicionado à amostra. Também pode ser encontrada através da diferença percentual entre as médias e o valor de que foi adicionado, sendo acrescido os intervalos de confiança (NATA, 2012; ANVISA, 2003). A Equação 4 apresenta a fórmula de como expressar a exatidão.

**Equação 4:**

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \%$$

Onde:

C1: concentração do analito obtido após a fortificação;

C2: concentração do analito na amostra;

C3: concentração do analito adicionado à amostra.

## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1. Equipamentos e reagentes

As determinações dos elementos químicos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn foram realizadas utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (FAAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometer*), marca Varian, modelo Spectra AA-220, que possui lâmpadas de cátodo oco como fonte de radiação (Varian e Agilent) e lâmpada de deutério para correção de sinal de fundo. A Tabela 2 apresenta os parâmetros instrumentais utilizados nas medidas realizadas por FAAS.

Neste trabalho, utilizou-se também o bloco digestor (Alfakit, AT 509), chapa de aquecimento (Biomixer 220), balança analítica (Shimadzu, modelo AY220) com precisão  $\pm 0,0001\text{g}$  e banho de ultrassom (Spencer, modelo CD-4800).

**Tabela 2:** Parâmetros instrumentais do FAAS.

Metal	$\lambda$ (nm)	i (mA)	fenda (nm)	Chama
Ca	422,7	10	0,5	N <sub>2</sub> O/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Cu	324,7	4	0,5	ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Fe	248,3	5	0,2	ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Mn	279,5	5	0,2	ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Zn	213,9	5	1,0	ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Mg	285,2	4	0,5	ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>

Foram utilizadas soluções padrão de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn (1000 µg/mL P.A. - BIOTEC) para o preparo das curvas analíticas. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida pelo sistema Gehaka OS 10LX. Também foram utilizados Ácido Nítrico (Carlo Erba, 65 % v/v) e Peróxido de Hidrogênio (BIOTEC, 35% m/v).

#### 4.2. Amostras de farinha de milho

As amostras de farinha de milho utilizadas nas análises foram dos tipos biju e floção provenientes de milhos amarelos e brancos. Estas amostras foram adquiridas em supermercados e indústrias fabricantes de farinha de milho em diferentes regiões do Estado do Paraná, sendo as amostras identificadas de acordo com os códigos apresentados na Tabela 3. Todas as amostras são isentas de fortificação com Fe durante o processo de industrialização (ANVISA, 2002).

**Tabela 3:** Amostras de farinha de milho amarela e branca e suas regiões de origem.

<b>Amostra</b>	<b>Município de Origem da Amostra</b>	<b>Tipo da farinha</b>	<b>Coloração</b>
A1	PRUDENTOPÓLIS	Bijú	Amarela
A2	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Amarela
A3	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Amarela
A4	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Amarela
A5	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Amarela
A6	GUAMIRANGA	Bijú	Amarela
A7	GUAMIRANGA	Bijú	Amarela
A8	IPIRANGA	Bijú	Amarela
A9	APUCARANA	Flocão	Amarela
A10	IVAÍ	Bijú	Amarela
A11	LARANJAL	Bijú	Amarela
A12	GUARAPUAVA	Bijú	Amarela
A13	PALMITAL	Bijú	Amarela
A14	IRATI	Bijú	Amarela

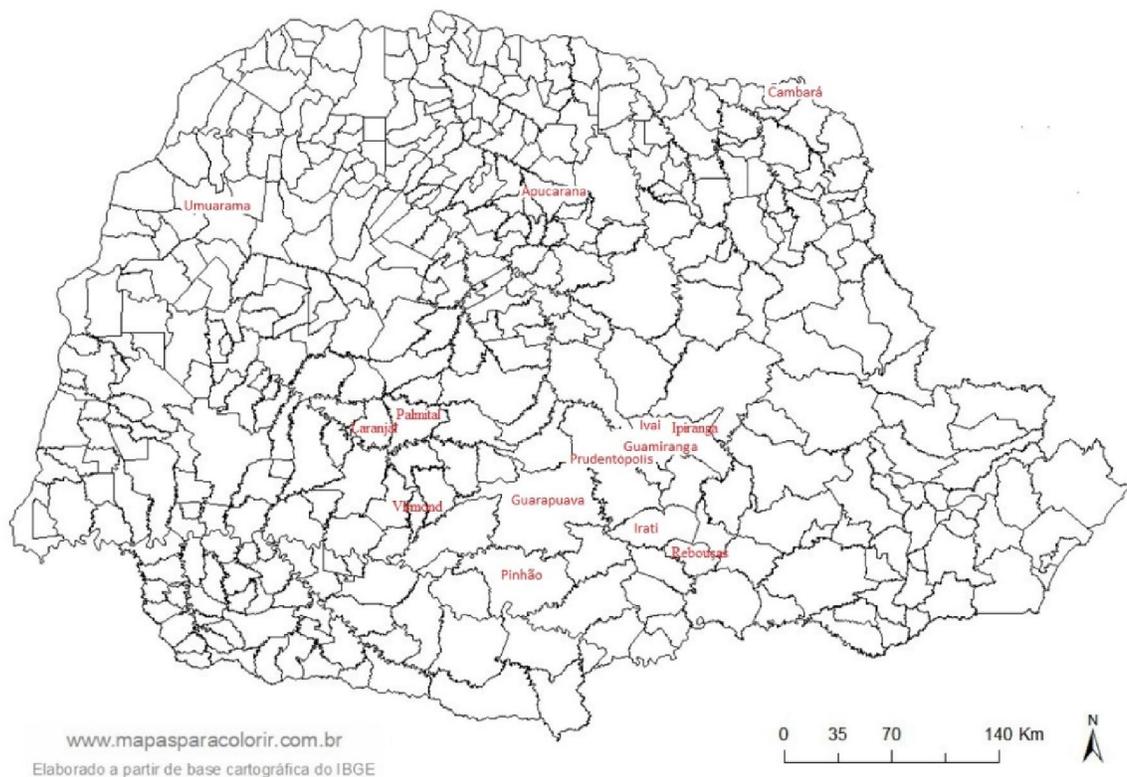
Continua

**Tabela 3. Continuação:** Amostras de farinha de milho amarela e branca e suas regiões de origem.

A15	IRATI	Bijú	Amarela
A16	IRATI	Bijú	Amarela
A17	CAMBARÁ	Bijú	Amarela
A18	UMUARAMA	Flocão	Amarela
A19	IVAÍ	Bijú	Amarela
A20	IVAÍ	Bijú	Amarela
A21	VIRMOND	Bijú	Amarela
A22	PINHÃO	Bijú	Amarela
A23	REBOUÇAS	Bijú	Amarela
B1	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Branca
B2	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Branca
B3	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Branca
B4	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Branca
B5	PRUDENTÓPOLIS	Bijú	Branca
B6	GUAMIRANGA	Bijú	Branca
B7	IRATI	Bijú	Branca
B8	VIRMOND	Bijú	Branca
B9	CAMPO LARGO	Bijú	Branca
B10	PINHÃO	Bijú	Branca
B11	IVAÍ	Bijú	Branca

Os municípios de origem das amostras estão representados no mapa do Paraná, na Figura 8.

## ESTADO DO PARANÁ: MUNICÍPIOS



**Figura 8:** Localização dos municípios de origem das amostras de farinha.

Todas as amostras foram colocadas em frascos plásticos descontaminados, sendo identificadas e armazenadas em local arejado e seco até o momento da análise. As amostras foram maceradas utilizando um almofariz e pistilo de plástico, previamente descontaminados. A maceração foi feita para diminuir o tamanho dos bijus e flocos até a amostra apresentar aparência de pequenas partículas, a fim de facilitar a pesagem e o processo de digestão da amostra. Em seguida, as amostras foram passadas em peneira com abertura de 1,0 mm (16 mesh). Todas as análises foram feitas em triplicata.

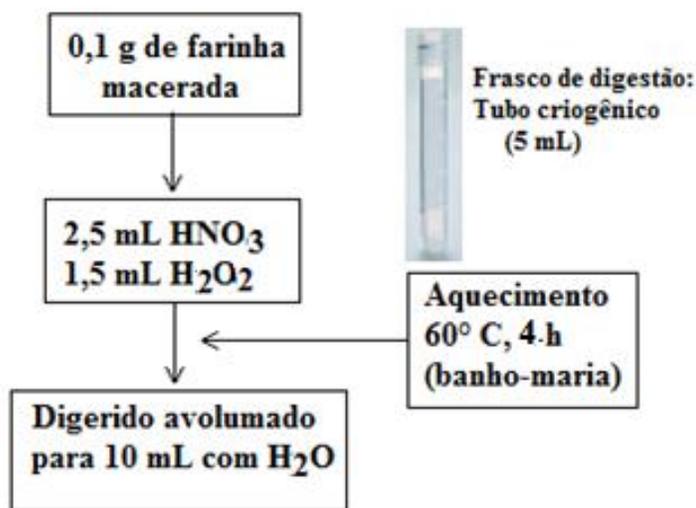
Todo o material utilizado, como frascos, vidrarias e recipientes utilizados foram descontaminados adequadamente em banho de ácido nítrico 5 % (v/v) pelo período de 24 horas e posteriormente lavadas com água destilada por 3 vezes.

### 4.3. Procedimentos para abertura das amostras

Para avaliar o método de preparo das amostras de farinha de milho, seis procedimentos de digestão ácida foram testados durante o desenvolvimento do projeto. A digestão por via úmida foi otimizada variando-se os frascos de digestão, volumes de reagentes e tipos de aquecimento. A digestão de soluções em "branco" foi realizada para cada um dos procedimentos de abertura de amostras avaliados.

#### 4.3.1. Digestão da farinha em meio ácido usando chapa de aquecimento

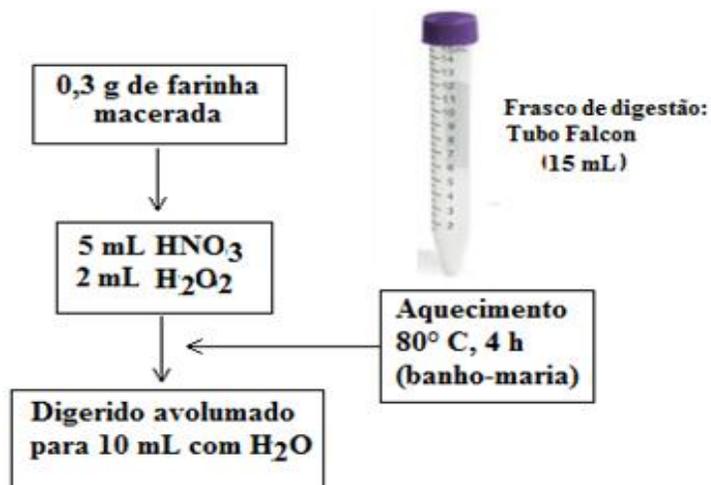
Inicialmente avaliou-se a digestão das amostras utilizando tubos graduados plásticos com tampas (tubos criogênicos) e aquecimento em banho-maria através de chapa de aquecimento. Os fluxogramas das Figuras 9 a 11 apresentam as condições experimentais usadas em cada procedimento.



**Figura 9.** Procedimento 1: Digestão da farinha de milho (amostra A1) usando tubo criogênico de 5 mL e aquecimento em banho-maria.



**Figura 10.** Procedimento 2: Digestão de farinha de milho (amostra A1) usando tubo Falcon de 50 mL e aquecimento em banho-maria.



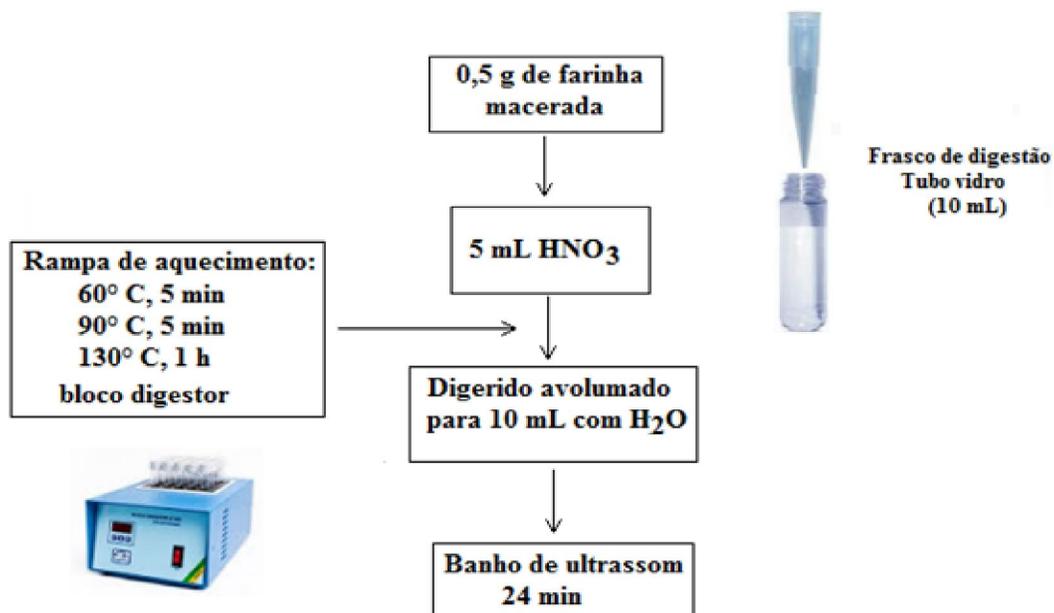
**Figura 11.** Procedimento 3: Digestão da farinha de milho (amostra A1) usando tubo Falcon de 15 mL e aquecimento em banho-maria.

#### 4.3.2. Digestão da farinha em meio ácido usando bloco digestor

Os procedimentos 4, 5 e 6 foram submetidos a aquecimento utilizando tubos de vidro e bloco digestor (Figuras 12 à 14). As tampas dos tubos foram substituídas por ponteiros de micropipetas para minimizar contaminações e proporcionar um sistema de refluxo do vapor de ácido nítrico durante o aquecimento.



**Figura 12.** Procedimento 4: Digestão da farinha de milho (amostra A1) usando tubos de vidro de 10 mL e bloco digestor (120°C).



**Figura 13.** Procedimento 5: Digestão da farinha de milho (amostra A1) usando tubos de vidro de 10 mL e bloco digestor com rampa de aquecimento.



**Figura 14.** Procedimento 6: Digestão da farinha de milho (amostra A1) usando tubos de vidro de 10 mL e bloco digestor (150°C).

#### 4.4. Validação da metodologia para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho

Para a validação do melhor procedimento proposto para digestão ácida das amostras de farinha de milho, foram avaliados os seguintes parâmetros estatísticos: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. A análise estatística aplicada à validação do método foi realizada no nível de 95 % de confiança utilizando o software estatístico Minitab versão 16.2.2. Para a validação da metodologia foi utilizada a amostra de farinha de milho A1.

##### 4.4.1. Curvas de Calibração

Foram utilizadas curvas de calibração externa, em triplicata, para a determinação dos metais nas amostras. As curvas analíticas para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn foram

realizadas utilizando as seguintes faixas de concentração, respectivamente: de 0,3 a 3,0 mg/L; 0,1 a 1,0 mg/L; 0,5 a 4,0 mg/L; 0,2 a 1,0 mg/L; 0,1 a 1,0 mg/L e 0,1 a 1,0 mg/L.

#### **4.4.2. Linearidade**

Com o intuito de verificar a linearidade das curvas analíticas utilizadas, a partir dos dados de calibração, realizou-se a análise de regressão linear e aplicou-se o teste de falta de ajuste, em um nível de confiança de 95%, utilizando o software Minitab (16.2.2) para o tratamento estatístico. A linearidade foi obtida a partir dos dados das medidas em triplicata das curvas analíticas para cada íon metálico.

#### **4.4.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)**

Foram realizadas 10 medidas do branco para que fosse possível calcular os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados pelo método da curva analítica, de acordo com ICH (1996), utilizando as Equações 1 e 2.

$$\text{Equação 1: } LD = 3SD/m$$

$$\text{Equação 2: } LQ = 10SD/m$$

Onde:

SD: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco

*m*: inclinação da curva de calibração

#### **4.4.4. Precisão**

A precisão do método foi analisada a partir do estudo da repetitividade e da precisão intermediária para todos os íons metálicos de interesse.

Para o teste de repetitividade, foram preparadas e realizadas três medidas das amostras durante o mesmo dia. Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram

preparadas e medidas em triplicata, durante 3 dias consecutivos. Amostras de farinha de milho foram fortificadas com todos os íons metálicos de interesse. Os valores de repetitividade e precisão intermediária foram calculados pelos desvios padrão relativos (RSD %) utilizando a Equação 3 (AOAC, 2012).

$$\text{Equação 3: } \text{RSD} = (s/x) \times 100$$

Em que:

$s$  é o desvio padrão da média das amostras;

$x$  é a média das amostras.

#### 4.4.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de estudos de recuperação por adição de padrão dos íons metálicos na amostra. As amostras de farinha de milho foram fortificadas com cada íon metálico (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) em dois níveis de concentrações conhecidos (0,5 e 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), sendo que as análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. A exatidão foi avaliada a partir da taxa de recuperação (%), de acordo com a Equação 4 (NATA 2012).

**Equação 4:**

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \%$$

Onde:

C1: concentração do analito obtido após a fortificação;

C2: concentração do analito na amostra;

C3: concentração do analito adicionado à amostra.

#### **4.5. Avaliação dos resultados por Análise de Componentes Principais**

Após a otimização e a validação do procedimento de digestão ácida, um total de 34 amostras de farinha de milho amarela e branca de várias regiões do Estado do Paraná foram analisadas por FAAS a fim de determinar a concentração dos íons metálicos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. Em seguida, a partir dos dados obtidos, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando o software Statistica (Versão 7.0).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Otimização do processo de digestão

Neste trabalho, inicialmente foram avaliados seis procedimentos de digestão de farinha de milho por via úmida com a intenção de minimizar contaminações, perdas dos analitos, diminuir os volumes de reagentes oxidantes e o tempo de digestão. A Tabela 4 apresenta as porcentagens de recuperação calculadas para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha dopadas com 1 mg/L de cada íon metálico.

**Tabela 4:** Recuperação de íons metálicos ( 1 mg/L ) em farinha de milho após processos de digestão distintos, n=3.

Procedimento de digestão	Recuperação, %					
	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
1	81,3 ± 6,8	73,6 ± 1,6	96 ± 11,0	72,8 ± 9,4	76,2 ± 9,3	75,5 ± 2,1
2	80,0 ± 7,1	94,0 ± 1,1	112,0 ± 8,3	83,6 ± 6,8	80,4 ± 1,8	78,0 ± 8,5
3	108,0 ± 7,5	77,0 ± 6,3	78,0 ± 2,4	127,0 ± 3,2	87,7 ± 7,9	74,7 ± 6,4
4	72,0 ± 8,7	85,0 ± 4,1	88,5 ± 11,2	87,0 ± 5,7	102,0 ± 2,6	125,0 ± 2,3
5	93,0 ± 3,82	98,0 ± 1,2	110,0 ± 5,3	97,0 ± 2,4	101,0 ± 1,3	106,0 ± 2,5
6	107,0 ± 3,8	83,0 ± 9,3	73,0 ± 2,2	114,0 ± 5,8	114,0 ± 4,8	120,0 ± 0,3

No procedimento 1 (Figura 9), iniciou-se os experimentos utilizando tubos criogênicos de 5 mL com suas respectivas tampas a fim de evitar perdas de amostra durante o aquecimento. Foram utilizados 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> e 1,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as amostras permaneceram em aquecimento por 4 horas. Contudo, visualmente, percebeu-se que a digestão não foi completa e que o volume do tubo não apresentou-se satisfatório para o processo, pois partículas das amostras ficaram aderidas nas paredes internas dos tubos e tampas. Os valores de recuperação encontrados para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn foram de 81,3, 73,6, 96,0, 72,8, 76,2 e 75,5 %, respectivamente, indicando digestão incompleta da farinha.

No procedimento 2 (Figura 10), trocou-se os tubos criogênicos de 5 mL por tubos Falcon de 50 mL com finalidade de aumentar o volume interno do frasco e impedir que partículas de farinha ficassem nas paredes do tubo. Também foi aumentada a massa da amostra, a fim de aumentar a concentração do elemento analisado no equipamento. O tempo usado neste procedimento foi de 4 horas. O digerido apresentou uma aparência melhor em relação ao procedimento 1, no entanto, ainda haviam partículas de fibras de milho suspensas em solução. O diâmetro interno do tubo Falcon era de 1,5 cm. Com isso, o nível do volume da amostra e reagentes ficava muito baixo e o aquecimento não foi satisfatório. Desta forma, o volume total do frasco era bem maior que o volume ocupado pela amostra, sendo assim, ao evaporar, os reagentes ocupavam um volume maior, o que diminuía o contato da amostra com os reagentes no estado gasoso. Neste caso, as porcentagens de recuperação variaram de 78,0 a 112,0 %, indicando uma melhora no processo para a liberação de Fe e Cu da matéria orgânica.

No procedimento 3 (Figura 11), alterou-se os volumes dos reagentes e novamente dos tubos Falcon (15 mL). O digerido apresentou melhor aparência em relação aos dois procedimentos anteriores, no entanto, as recuperações dos metais ainda não foram satisfatórias, variando de 74,7 a 127 %. Observou-se que o menor diâmetro interno deste tubo possibilitou um aquecimento mais homogêneo da amostra.

Nestes três primeiros procedimentos foi utilizado como fonte de calor uma chapa de aquecimento e os tubos aquecidos em banho-maria. Observou-se que a baixa temperatura de aquecimento desses 3 primeiros procedimentos estava sendo insuficiente na digestão da farinha de milho mesmo usando volumes de oxidantes maiores. Com isso, passou-se a utilizar um bloco digestor com controle de temperatura a partir do procedimento 4.

No procedimento 4 (Figura 12) passou-se a utilizar tubos de vidro de 10 mL com ponteiros de micropipetas no lugar das tampas, pois em estudos anteriores do grupo de pesquisa LabGati-Unicentro, verificou-se contaminação por Zn nas amostras provenientes das tampas dos tubos de vidro. As ponteiros, por possuírem pequeno orifício, permitiam a saída da pressão do sistema e ainda atuaram como aparato de refluxo dos gases dentro do tubo durante a digestão. No procedimento 4, os íons metálicos apresentaram valores de recuperações que variaram entre 72,0 a 125,0 %. Neste procedimento observou-se que a presença de peróxido de hidrogênio e uma temperatura de 120 °C produziu uma efervescência elevada até a abertura do tubo de vidro, ocasionando perda de amostra .

No procedimento 5 (Figura 13), excluiu-se o peróxido de hidrogênio da digestão e aplicou-se uma rampa de aquecimento durante o processo, onde as temperaturas permaneciam em 60° e 90 °C por 5 min e 130 °C por 1 h. A rampa de aquecimento impediu a ebulição brusca do material e perda de amostra. Após a digestão, ainda era visível pequenas partículas na solução após avolumar a mesma para 10 mL. Para completar a solubilização dessas partículas, levou-se o digerido já avolumado para banho de ultrassom por 24 min. A solubilização ocorreu completamente porque o equipamento de ultrassom agita intensamente as moléculas presentes na solução, causando efeito de cavitação que consiste na formação e colapso de microbolhas de gás na solução da amostra, dessa forma as pequenas partículas sólidas restantes acabam sendo solubilizadas. Além disso, a utilização do ultrassom permite aumentar a liberação de íons metálicos na solução que estavam complexado na amostra, deixando-os mais acessíveis para a atomização (MIZUKOSHI et al., 1999). Com este procedimento, as recuperações dos íons metálicos nas amostras de farinha foram satisfatórias (93,0 a 110,0 %).

Mesmo obtendo-se recuperações satisfatórias com o procedimento 5 (Figura 5), avaliou-se a alternativa de utilizar uma massa maior de amostra (1g) e aquecimento direto do bloco a 150 °C, isto é, sem rampa de aquecimento, chamado de procedimento 6 (Figura 14). Neste caso, as recuperações de Fe e Cu não foram satisfatórias, sendo as mesmas de 73,0 e 83,0 %, respectivamente. Entre os procedimentos 5 e 6, pode-se observar que o aquecimento mais lento, em etapas diferentes de temperatura, melhorou significativamente a digestão da farinha. Durante os estudos de preparo, observou-se que a casquinha que envolve o grão do milho sempre é a mais difícil de digerir.

Como observado na Tabela 4, o procedimento que apresentou melhor eficiência de recuperação para todos os metais avaliados foi o procedimento 5. Portanto, a validação do método de preparo de amostras foi realizada para este procedimento .

Ao compararmos o procedimento 5 proposto neste trabalho com os poucos métodos descritos em literatura, sobre a digestão de farinhas de milho, pode-se observar que este procedimento apresentou excelente eficiência de recuperação para todos os metais avaliados, e um tempo de digestão relativamente curto (~1:30 h), como demonstrado na Tabela 5. Além de um tempo curto de preparo, o procedimento descrito neste trabalho mostrou-se mais simples, pois necessita da adição de apenas um reagente à amostra quando comparado à outras metodologias da literatura.

**Tabela 5:** Procedimentos de digestão por via úmida para amostras de farinhas e derivados de milho.

<b>Amostra</b>	<b>Digestão ácida</b>	<b>Tempo digestão (h)</b>	<b>Referência</b>
Farinha de milho biju (amarela e branca) e flocão (amarela)	HNO <sub>3</sub>	1:10 h + sonicação em ultrassom (24 min)	Este trabalho
Chips de milho	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :HNO <sub>3</sub>	48 h repouso + aquecimento até tornar-se límpida + sonicação	HARIRI et al (2015)
Farinhas de milho e trigo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :HNO <sub>3</sub>	3:30 h + sonicação em ultrassom	BOEN et al. (2007)
Farinha de milho	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :HNO <sub>3</sub>	aquecimento até obtenção de líquido incolor (não cita o tempo)	SANTOS et al. (2015)

## 5.2. Validação do Procedimento 5

### 5.2.1. Linearidade

A análise da linearidade em uma determinada faixa de trabalho corresponde à capacidade do método que está sendo validado em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse (RIBANI et al., 2004).

A fim de avaliar a linearidade da faixa de concentração estudada, foram construídas curvas de padrão externo para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn utilizando as seguintes faixas de concentração, respectivamente: de 0,3 a 3,0 mg/L; 0,1 a 1,0 mg/L; 0,5 a 4,0 mg/L; 0,2 a 1,0

mg/L; 0,1 a 1,0 mg/L e 0,1 a 1,0 mg/L. Para cada curva analítica foram utilizados 5 pontos de concentrações diferentes de cada metal.

Aplicou-se aos resultados obtidos a técnica de regressão linear no nível de 95 % de confiança. Os resultados encontram-se na Tabela 6. Verificou-se que o modelo linear foi significativo para as faixas de concentração estudadas, pois os valores de  $F_{regressão}$  foram maiores do que os valores de  $F_{crítico (0,05; 1, 13)} = 4,67$  e os valores de  $p$  foram menores do que 0,05 em um nível de confiança de 95 %. Portanto, os modelos lineares para as faixas de concentração analisadas não apresentaram falta de ajuste, pois os valores observados de  $F_{falta de ajuste}$  foram menores que os valores de  $F_{crítico (0,05; 3, 10)} = 3,71$  e os valores de  $p$  foram maiores do que 0,05.

**Tabela 6:** Resultados da análise de regressão linear no nível de 95 % de confiança utilizando o procedimento 5.

<b>Parâmetros da Regressão Linear</b>				
<b>Metal</b>	$F_{regressão}$	<i>valor de p</i>	$F_{falta de ajuste}$	<i>valor de p</i>
<b>Cu</b>	13557,36	0,000	0,49	0,699
<b>Fe</b>	313,98	0,000	0,12	0,945
<b>Mn</b>	3354,23	0,000	0,02	0,996
<b>Zn</b>	18845,77	0,000	0,46	0,714
<b>Ca</b>	489,83	0,000	0,04	0,989
<b>Mg</b>	59,89	0,000	0,12	0,944

### 5.2.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima do analito que pode ser detectado em um determinado nível de confiança, já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (SKOOG, 2006; ANVISA, 2003). Esses parâmetros foram utilizados para avaliar a sensibilidade do método de digestão de amostras de farinha de milho para determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, e Zn por F AAS.

Para calcular os valores de LD e de LQ para o método de digestão utilizado, foi determinado o desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco para os metais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn) e foi utilizado o valor da inclinação da curva analítica de cada metal. Os limites de detecção e de quantificação obtidos estão representados na Tabela 7. Os limites de quantificação e de detecção ficaram abaixo dos valores do primeiro ponto das curvas analíticas para Ca (0,3 mg/L), Cu (0,1 mg/L), Fe (0,5 mg/L), Mg (0,2 mg/L), Mn (0,1 mg/L) e Zn (0,1 mg/L), mostrando que o método utilizado apresenta boa sensibilidade para os metais investigados, podendo dessa forma ser utilizado para análise das amostras de interesse.

**Tabela 7:** Resultados dos valores de LD e LQ do procedimento 5 para as determinações dos metais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho por FAAS.

	<b>Ca</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>
<b>LQ (mg/L)</b>	0,04	0,02	0,13	0,08	0,02	0,02
<b>LD (mg/L)</b>	0,01	0,006	0,04	0,02	0,007	0,006

### 5.2.3. Exatidão

Para verificar a exatidão do método empregado, foram realizados estudos através de testes de recuperação por adição de padrão nas amostras de farinha em dois níveis de concentração diferentes (0,5 mg/L e 1,0 mg/L) para cada íon metálico de interesse (Tabela 8).

**Tabela 8:** Resultados da porcentagem recuperada utilizando o procedimento 5 para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostra de farinha de milho nos níveis de 0,5 e 1,0 mg/L.

<b>Metal</b>	<b>Concentração adicionada (mg/L)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Ca</b>	0,5	109,0 ± 4,2
	1,0	93,0 ± 3,8
<b>Cu</b>	0,5	110,0 ± 6,7
	1,0	98,0 ± 1,2
<b>Fe</b>	0,5	98,0 ± 3,1
	1,0	110,0 ± 5,3
<b>Mg</b>	0,5	96,0 ± 2,8
	1,0	97,0 ± 2,4
<b>Mn</b>	0,5	110,0 ± 4,2
	1,0	101,0 ± 1,3
<b>Zn</b>	0,5	108,0 ± 5,6
	1,0	106,0 ± 2,5

A partir da Tabela 8, pode-se perceber que a porcentagem de recuperação dos íons metálicos de interesse utilizando o método proposto nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/L estão dentro do estabelecido pela AOAC (2012) que é de 80 – 110%, no nível de concentração estudada, o que indica que o método utilizado neste trabalho para determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho apresenta exatidão adequada para análise.

#### **5.2.4. Precisão e Repetitividade**

Para analisar a confiabilidade do método desenvolvido e utilizado no trabalho, foi realizado o estudo de precisão através do cálculo das estimativas de repetitividade (realizada no mesmo dia) e de precisão intermediária, realizada em 3 dias consecutivos (ANVISA, 2003).

Para verificar a repetitividade do método foram preparadas e realizadas análises em triplicata da mesma amostra no mesmo dia para todos os metais de interesse.

A fim de analisar a repetitividade do método realizado, foi calculado o RSD para todos os metais de interesse para verificar se estes se encontram dentro do limite do coeficiente de variação estabelecido pela AOAC (2012). Os resultados do RSD encontram-se na Tabela 9. Observa-se que os valores encontrados para RSD (%) foram inferiores ao valor indicado pela AOAC (2012) na faixa de concentração investigada, que é de até 7,3%. Isso demonstra que o método de digestão e determinação utilizados foi apropriado para amostras de farinha de milho.

**Tabela 9:** Valores de RSD para a repetitividade para determinação de Ca, Cu Fe, Mg, Mn e Zn em amostra de farinha de milho no mesmo dia utilizando o procedimento 5.

<b>Metal</b>	<b>Média (mg/kg)</b>	<b>RSD %</b>
Ca	29,52 ± 0,887	3,00
Cu	0,482 ± 0,026	5,39
Fe	4,291 ± 0,129	3,01
Mg	28,31 ± 1,342	4,74
Mn	0,587 ± 0,019	3,24
Zn	0,486 ± 0,017	3,50

Para se obter a precisão intermediária, foram realizadas análises em 3 dias diferentes, sendo as amostras digeridas e medidas em triplicata. Foi realizado o cálculo do RSD (%) para verificar se os valores encontrados estão dentro do limite proposto pela AOAC (2012). Os resultados obtidos para precisão intermediária para o método utilizado encontra-se na Tabela 10. Observou-se que os valores do RSD calculados para a precisão intermediária estão abaixo do limite proposto pela AOAC (2012) que é de 15,00%, portanto, indicando precisão intermediária adequada para o método proposto.

**Tabela 10:** Os resultados das médias das concentrações e do RSD para Ca, Cu, Fe, Mg Mn e Zn em amostra de farinha de milho em 3 dias diferentes.

<b>Metal</b>	<b>Média (mg/kg)</b>	<b>RSD %</b>
<b>Ca</b>	27,09 ± 3,672	13,55
<b>Cu</b>	0,457 ± 0,017	3,72
<b>Fe</b>	5,927 ± 0,574	9,68
<b>Mg</b>	31,85 ± 2,6	8,16
<b>Mn</b>	0,651 ± 0,06	9,22
<b>Zn</b>	0,428 ± 0,029	6,77

### **5.3. Determinação de íons metálicos em amostras de farinha de milho**

Após os estudos de otimização do método de digestão de farinhas de milho, todas as amostras adquiridas foram submetidas ao processo proposto (Procedimento 5), sendo em seguida realizadas as medidas dos metais utilizando a FAAS. Todas as análises foram feitas em triplicata. Ao todo foram analisadas 23 amostras de farinhas de milho amarela do tipo biju e flocão e 11 amostras de farinhas de milho branca do tipo biju. A diferença entre o os tipos biju e flocão está no tamanho dos flocos das farinhas. Todas estas amostras foram adquiridas no comércio e em indústrias fabricantes no Estado do Paraná. Essas amostras são isentas de enriquecimento com Fe no processo industrial (ANVISA, 2002).

A quantidade de amostras da farinha branca adquiridas neste projeto foi menor em relação as amarelas devido ao número de marcas disponíveis no mercado ser significativamente menor em relação a farinha amarela. A farinha amarela é mais consumida do que a farinha branca. Além disso, o preço também contribui para a menor produção, sendo que um pacote de 1 kg de farinha branca chega a ser cerca de 30% mais caro que 1 kg de farinha amarela. Desta forma, muitas empresas optam por produzir somente a farinha de milho amarela, que tem um volume comercial maior, o que torna amostras de farinha branca menos disponíveis no comércio.

As Tabelas 11 e 12 apresentam as concentrações de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn, com seus respectivos desvios-padrão, determinados em farinhas amarela e branca, respectivamente. As Figuras 15 e 16 apresentam os resultados na forma de gráficos.

**Tabela 11:** Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho amarela utilizando o procedimento 5; n=3.

<b>Amostra</b>	<b>Ca</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>
	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>
	44,99 ±	0,53 ±	6,60 ±	119,4 ±	1,57 ±	1,72 ±
A1	5,56	0,04	0,69	1,86	0,10	0,12
	31,23 ±	0,47 ±	5,69 ±	90,75 ±	1,42 ±	2,55 ±
A2	5,35	0,04	0,52	6,05	0,13	0,33
	196,30 ±	0,26 ±	12,18 ±	63,96 ±	0,69 ±	0,60 ±
A3	6,13	0,05	0,92	6,32	0,07	0,05
	88,67 ±	0,59 ±	4,11 ±	64,91 ±	0,79 ±	1,62 ±
A4	6,61	0,06	0,04	0,73	0,06	0,04
	31,58 ±	0,58 ±	7,25 ±	118,1 ±	2,09 ±	1,91 ±
A5	3,04	0,02	0,30	0,86	0,12	0,35
	22,73 ±	0,40 ±	15,11 ±	48,23 ±	1,16 ±	0,862 ±
A6	1,31	0,06	0,01	2,25	0,11	0,01
	141,48 ±	1,033 ±	10,39 ±	180,33 ±	2,342 ±	4,575 ±
A7	9,68	0,025	0,228	13,89	0,078	0,123
	18,77 ±		12,35 ±	70,02 ±	0,48 ±	0,53 ±
A8	1,38	ND	0,08	4,32	0,05	0,04
	83,29 ±		1,02 ±	120,30 ±	0,51 ±	1,76 ±
A9	6,44	ND	0,12	9,42	0,04	0,21
	15,13 ±	0,23 ±	9,99 ±	35,72 ±	1,28 ±	1,24 ±
A10	2,23	0,02	0,17	2,08	0,03	0,11
	17,03 ±	0,56 ±	8,63 ±	38,97 ±		
A11	0,46	0,05	0,99	1,15	ND	ND
	15,34 ±	0,84 ±	15,42 ±	40,77 ±	2,66 ±	0,96 ±
A12	0,19	0,04	1,36	3,08	0,17	0,05

Continua

**Tabela 11. Continuação:** Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho amarela utilizando o procedimento 5 para o preparo das amostras; n=3.

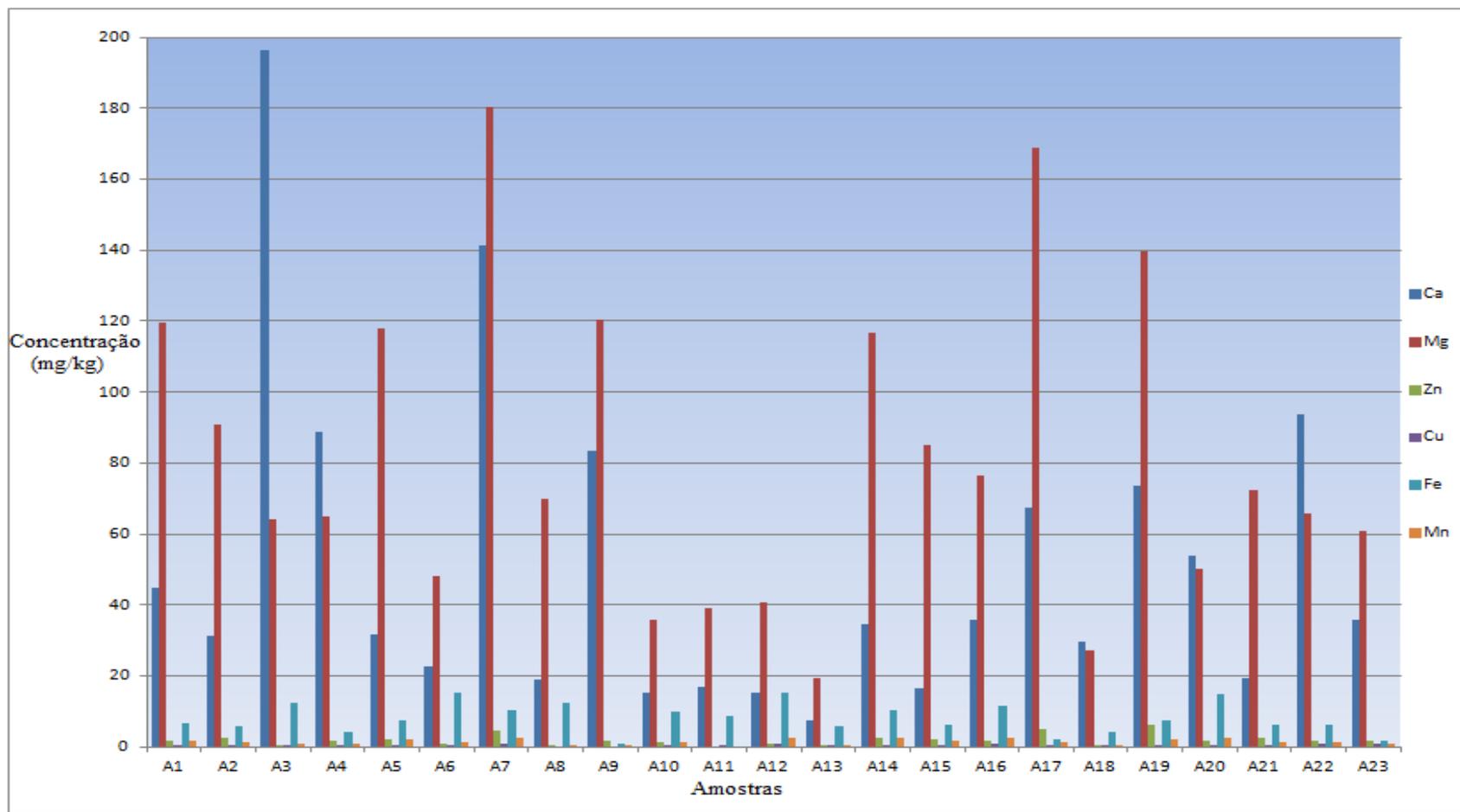
	7,51 ±	0,316 ±	5,66 ±	19,54 ±	0,44 ±	0,59 ±
A13	1,14	0,01	0,15	1,59	0,01	0,03
	34,43 ±	0,31 ±	10,39 ±	116,60 ±	2,72 ±	2,69 ±
A14	1,48	0,01	0,15	4,76	0,13	0,28
	16,61 ±	0,64 ±	6,09 ±	85,07 ±	1,70 ±	1,98 ±
A15	1,31	0,03	0,24	1,32	0,04	0,11
	35,83 ±	0,86 ±	11,59 ±	76,27 ±	2,49 ±	1,60 ±
A16	1,86	0,07	0,91	0,58	0,22	0,13
	67,37 ±	0,291 ±	1,959 ±	168,81 ±	1,185 ±	4,936 ±
A17	4,442	0,006	0,097	9,374	0,138	0,203
	29,52 ±	0,482 ±	4,291 ±	26,98 ±	0,603 ±	0,478 ±
A18	0,887	0,026	0,129	2,137	0,048	0,013
	73,65 ±	0,32 ±	7,506 ±	139,8 ±	2,037 ±	6,253 ±
A19	1,396	0,021	0,559	7,849	0,190	0,424
	53,94 ±	0,413 ±	14,69 ±	50,02 ±	2,500 ±	1,870 ±
A20	4,935	0,014	1,321	4,822	0,161	0,051
	19,18 ±	0,363 ±	6,228 ±	72,16 ±	1,089 ±	2,352 ±
A21	0,777	0,007	0,372	3,535	0,006	0,150
	93,81 ±	0,821 ±	6,213 ±	65,82 ±	1,309 ±	1,549 ±
A22	1,690	0,016	0,514	0,840	0,037	0,065
	35,75 ±	1,006 ±	1,694 ±	60,81 ±	0,797 ±	1,572 ±
A23	1,633	0,018	0,185	1,370	0,088	0,063
Média	51,04	0,49	8,05	81,45	1,38	1,92

ND: Não detectado.

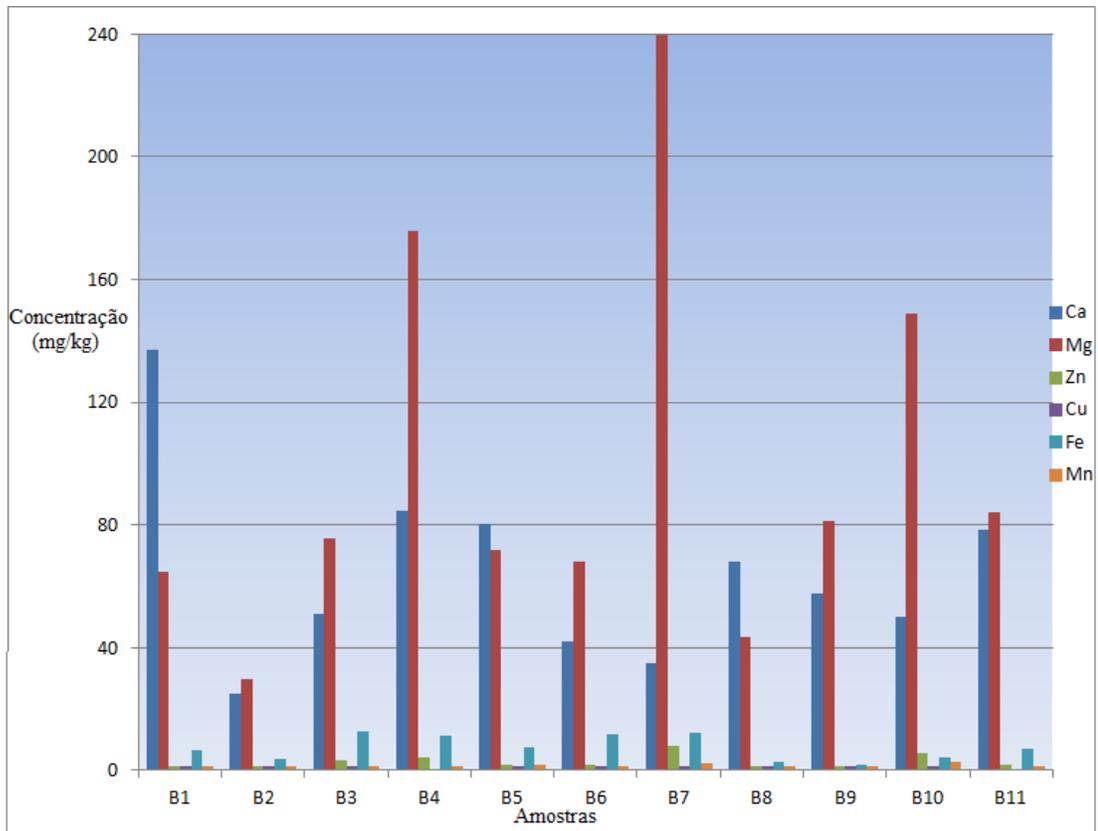
**Tabela 12:** Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho branca utilizando o procedimento 5; n=3.

<b>Amostra</b>	<b>Ca (mg/kg)</b>	<b>Cu (mg/kg)</b>	<b>Fe (mg/kg)</b>	<b>Mg (mg/kg)</b>	<b>Mn (mg/kg)</b>	<b>Zn (mg/kg)</b>
B1	137,1 ± 10,89	0,545 ± 0,038	6,557 ± 0,007	64,55 ± 1,387	1,451 ± 0,056	1,438 ± 0,073
B2	25,09 ± 0,424	0,291 ± 0,018	3,729 ± 0,298	29,53 ± 0,954	1,325 ± 0,088	0,238 ± 0,007
B3	51,15 ± 1,057	0,669 ± 0,035	12,42 ± 0,095	75,68 ± 1,435	0,708 ± 0,055	3,365 ± 0,175
B4	84,63 ± 7,071	ND	11,39 ± 0,657	175,9 ± 12,37	0,655 ± 0,029	4,088 ± 0,014
B5	80,31 ± 1,761	0,585 ± 0,041	7,418 ± 0,627	71,61 ± 3,889	1,555 ± 0,026	1,706 ± 0,155
B6	41,81 ± 2,298	0,783 ± 0,038	11,58 ± 0,061	67,85 ± 2,726	1,481 ± 0,096	1,946 ± 0,178
B7	34,79 ± 2,276	0,687 ± 0,031	12,30 ± 0,426	239,6 ± 1,273	2,421 ± 0,052	7,856 ± 0,064
B8	67,94 ± 6,647	0,727 ± 0,029	2,595 ± 0,331	43,61 ± 4,044	0,985 ± 0,0212	0,957 ± 0,104
B9	57,60 ± 4,263	1,011 ± 0,080	1,723 ± 0,117	81,31 ± 3,585	0,741 ± 0,031	1,037 ± 0,086
B10	50,22 ± 3,754	1,036 ± 0,129	4,084 ± 0,283	149,1 ± 1,279	2,487 ± 0,0277	5,783 ± 0,498
B11	78,26 ± 5,735	ND	7,069 ± 0,163	84,14 ± 4,386	0,614 ± 0,012	1,697 ± 0,098
Média	64,44	0,57	7,35	98,44	1,31	2,74

ND: Não detectado.



**Figura 15:** Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho amarela utilizando o procedimento 5.



**Figura 16:** Concentração (mg/kg) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de farinha de milho branca utilizando o procedimento 5.

As médias das concentrações encontradas para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas amostras de farinha amarela foram respectivamente de 51,04; 0,49; 8,05; 81,45; 1,38 e 1,92 mg/kg, respectivamente. Já as médias das concentrações determinadas para esses mesmos metais nas amostras de farinha branca foram 64,44; 0,57; 7,35; 98,44; 1,31 e 2,74 mg/kg, respectivamente.

Foi realizado um *teste-t* no nível de 95 % de confiança para verificar se existem diferenças significativas entre os teores minerais nas farinhas amarela e branca, utilizando as médias amostrais de no nível de 95 % de confiança. Os resultados do *teste-t* estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13:** Aplicação do *teste-t* para diferenças significativas entre as concentrações de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em farinhas amarela e branca.

<i>Teste-t</i>			
<b>Metal</b>	<i>t calculado</i>	<i>valor - p</i>	<i>Intervalos de confiança para a</i>
			<i>diferença das médias</i>
<b>Ca</b>	1,01	0,323	(-40,7 – 13,9)
<b>Cu</b>	0,69	0,497	(-0,341 – 0,172)
<b>Fe</b>	0,46	0,649	(-2,44 – 3,83)
<b>Mg</b>	0,80	0,435	(-62,4 – 28,4)
<b>Mn</b>	0,28	0,778	(-0,467 – 0,616)
<b>Zn</b>	1,06	0,308	(-2,469 – 0,838)

A análise do *teste-t* indicou que não existem diferenças significativas entre as médias amostrais de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn para as farinhas analisadas (amarela e branca), pois os valores de *t calculado* foram inferiores aos valores de *t crítico* para cada metal, todos com  $p > 0,05$ : para Ca o *t crítico*  $(0,05,28) = 2,048$ , para Cu o *t crítico*  $(0,05,16) = 2,120$ , para Fe o *t crítico*  $(0,05,20) = 2,086$ , para Mn o *t crítico*  $(0,05,23) = 2,069$ , para Mg o *t crítico*  $(0,05,14) = 2,145$  e para Zn o *t crítico*  $(0,05,14) = 2,145$ .

A fim de comprovar esses resultados, foram construídos intervalos de confiança para a diferença das médias para cada metal analisado, sendo possível observar na Tabela 10 que os intervalos de confiança incluem o zero, confirmando que não existem diferenças significativas entre os teores metálicos de farinhas brancas e amarelas analisadas.

Observou-se que íons metálicos que se apresentaram em maior quantidade em todas as amostras foram o Ca e o Mg, ou seja, eles são os elementos mais abundantes nas amostras avaliadas. Já o Cu foi o elemento encontrado em menor quantidade nas mesmas.

Com relação a farinha amarela, pode-se observar que as amostras A6, A10, A11, A12, A13 e A18 apresentaram as menores concentrações dos íons metálicos entre as 23 amostras analisadas. As amostras A6 e A10 são de municípios vizinhos, enquanto as amostras A11, A12 e A13 são de municípios próximos, o que sugere que a composição mineral dessas amostras podem estar relacionada à região de origem. Já a amostra A18, produzida no município de Umuarama (oeste do estado), está localizada muito longe das demais.

Já as amostras A1, A3, A5, A9, A14, A17 e A19 apresentaram os maiores teores de minerais entre as 23 amostras. As amostras A1, A3 e A5 são do município de Prudentópolis e as amostras A9 e A19 são de Irati e Ivaí respectivamente, ambas são cidades vizinhas, o que explicaria o teor mineral parecido, enquanto as amostras A14 e A17 são de Apucarana e Cambará respectivamente, ambas são da região norte do estado, o que sugere que há um teor mineral parecido entre elas.

Quanto as amostras de farinha branca, a que apresentou menores valores dos metais avaliados, foi a amostra B2, do município de Prudentópolis. Esta amostra se diferencia das outras do mesmo município devido a origem do milho, que foi proveniente de uma região mais ao sul do município. Já a amostra de farinha branca que apresentou a maior concentração de minerais foi a B7, proveniente do município de Irati.

Os valores determinados para Cu, Mn e Zn neste trabalho, diferem dos valores médios encontrados por SANTOS et al. (2004) em farinha de milho, que foram respectivamente de 1,0; 3,1 e 9,0 mg/kg. Isso pode ser explicado devido a origem do solo, uma vez que as farinhas analisadas por SANTOS et al. (2004) foram obtidas somente na cidade do Rio de Janeiro.

Já as médias determinadas por ARAÚJO em 4 amostras de farinha amarela produzidas em Sergipe foram de 5,0 (Ca); 0,5 (Cu); 15,26 (Fe); 95,0 (Mg); 0,62 (Mn) e 2,05 (Zn) mg/kg utilizando ICP-MS. Pode-se observar que as concentrações de Cu, Mg e Zn foram parecidas com as encontradas neste trabalho. Entretanto, essa semelhança não existe nos outros metais avaliados, sugerindo que o teor mineral pode variar dependendo da região de cultivo do milho.

Na Tabela 14, foi apresentada uma comparação entre os resultados médios da composição mineral das farinhas de milho amarela deste trabalho com os dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) para 100 g de farinha. Entretanto, não há valores de Mn demonstrados pela TACO (2011) para farinha amarela e também não há valores de referência de metais para a farinha branca.

**Tabela 14:** Comparação entre os valores de referência (TACO, 2011) de metais e os obtidos em farinha de milho amarela em mg para cada 100 g.

	<b>Ca (mg)</b>	<b>Cu (mg)</b>	<b>Fe (mg)</b>	<b>Mg (mg)</b>	<b>Mn (mg)</b>	<b>Zn (mg)</b>
TACO, 2011	1	0,27	2,3	31	-	0,6
Este trabalho	5,1	0,05	0,8	8,1	0,13	0,19

Pode-se observar que o valor médio do Ca determinado nas farinhas do Paraná foi 5 vezes maior em relação ao apresentado pela TACO e menores para os demais metais.

#### **5.4. Avaliação de Contribuição Nutricional**

De acordo com a ANVISA (2005), a INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn para pessoas adultas, com peso acima de 70 kg, é de respectivamente: 1000; 0,9; 14; 260; 2,3 e 7 mg respectivamente. Desta forma, calculou-se a contribuição das farinhas de milho amarela e branca para a IDR de cada mineral, simulando um consumo diário de 100 g de farinha de milho, com os valores médios determinados nas farinhas de milho branca e amarela (Tabela 15). Para este cálculo, considerou-se os valores da IDR recomendada pela ANVISA (2005) citados acima. A partir das médias das concentrações determinadas foi calculado a quantidade dos metais presente em 100 g de farinha amarela e branca. Em seguida, foi calculado o valor de porcentagem que essa quantidade representa em relação à IDR, mostrando assim a contribuição que o consumo diário de 100 g de farinha (amarela e branca) representa no total da IDR recomendada de cada mineral.

**Tabela 15:** Cálculo da contribuição à Ingestão Diária Recomendada a partir do consumo das farinhas de milho amarela e branca produzidas do Estado do Paraná considerando um consumo diário de 100 g .

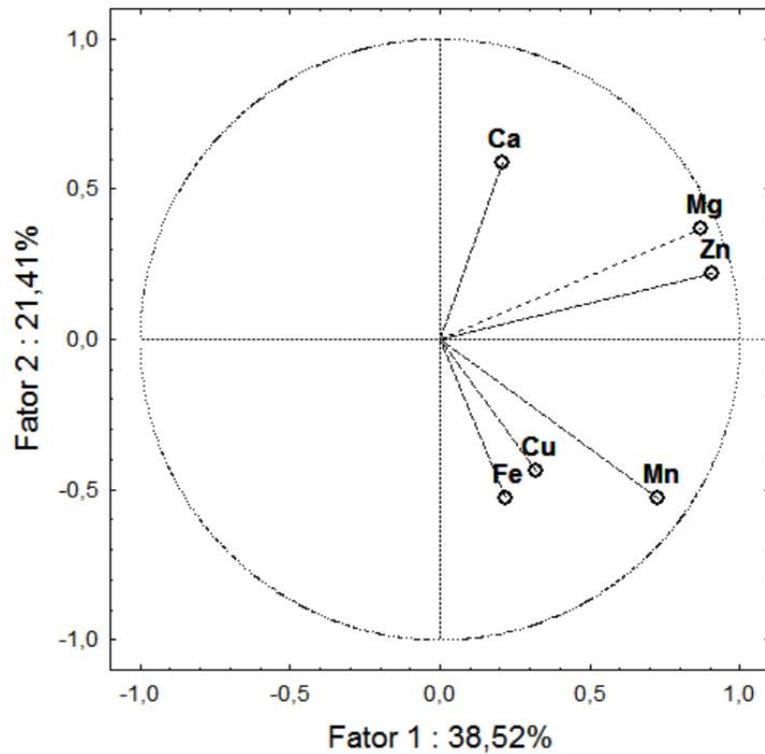
	<b>Porcentagem de contribuição à IDR (%)</b>					
<b>Farinha</b>	<b>Ca</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>
amarela	0,51	5,4	5,75	3,13	6,02	2,74
branca	0,64	6,4	5,25	3,79	5,7	3,91

Conforme observado na Tabela 15, as farinhas de milho possuem sua maior contribuição nutricional à IDR dos minerais Mn, Fe e Cu, seguido do Mg e Zn. Além disso, observou-se que as farinhas de milho possuem pouca contribuição para atingir a IDR de Ca.

### **5.5. Análise de Componentes Principais**

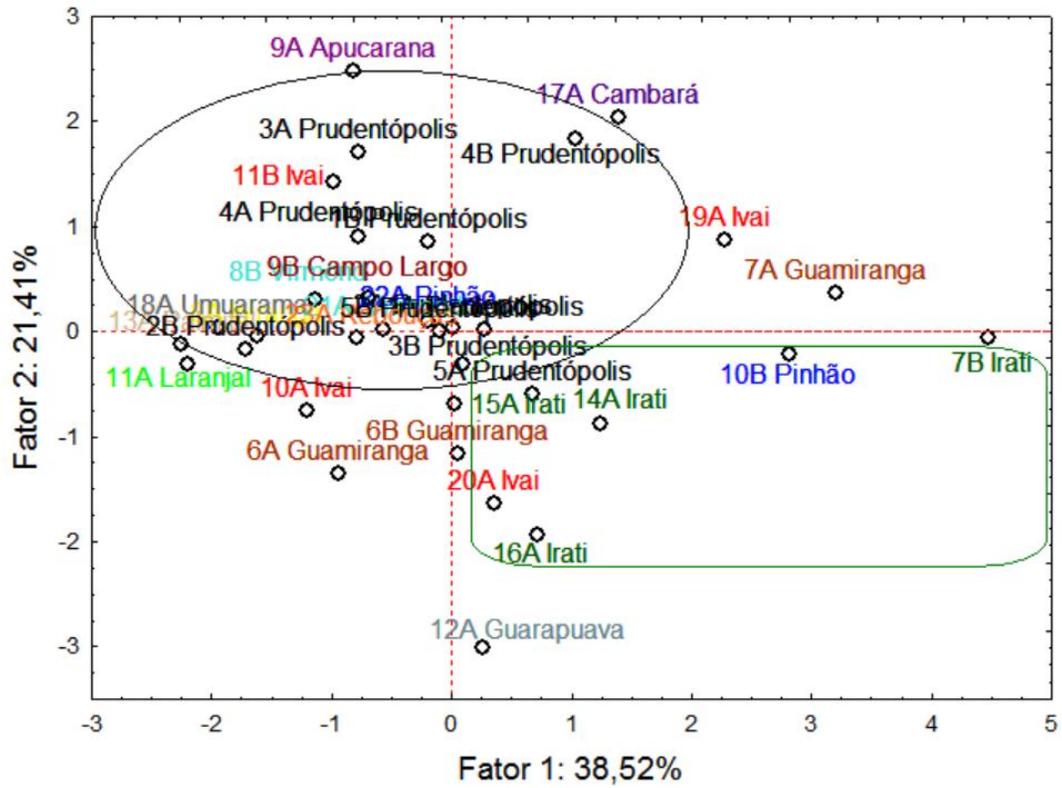
Foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP) para visualizar o conjunto de amostras como um todo e verificar a existência de correlações entre as 34 amostras de farinhas de milho. A ACP foi aplicada aos dados experimentais auto-escalados para verificar as possíveis semelhanças e/ou diferenças entre as amostras e sua correlação entre as variáveis Ca, Mg, Zn, Cu, Fe e Mn. Os gráficos da ACP explicaram 38,52 % pelo fator 1 e 21,41 % pelo fator 2, totalizando 59,93 % de explicação dos dados.

A Figura 17 apresenta o gráfico das variáveis onde os íons metálicos Ca, Fe, Mn, Mg, Cu e Zn se correlacionam positivamente pelo fator 1 (eixo positivo de X), enquanto que Ca, Mg e Zn são inversamente correlacionados a Fe, Cu e Mn pelo fator 2 (eixo y da ACP). As Figuras 18 e 19 apresentam os gráficos das amostras na ACP, uma apontando os locais de produção das farinhas e outra diferenciando as farinhas amarelas das brancas.



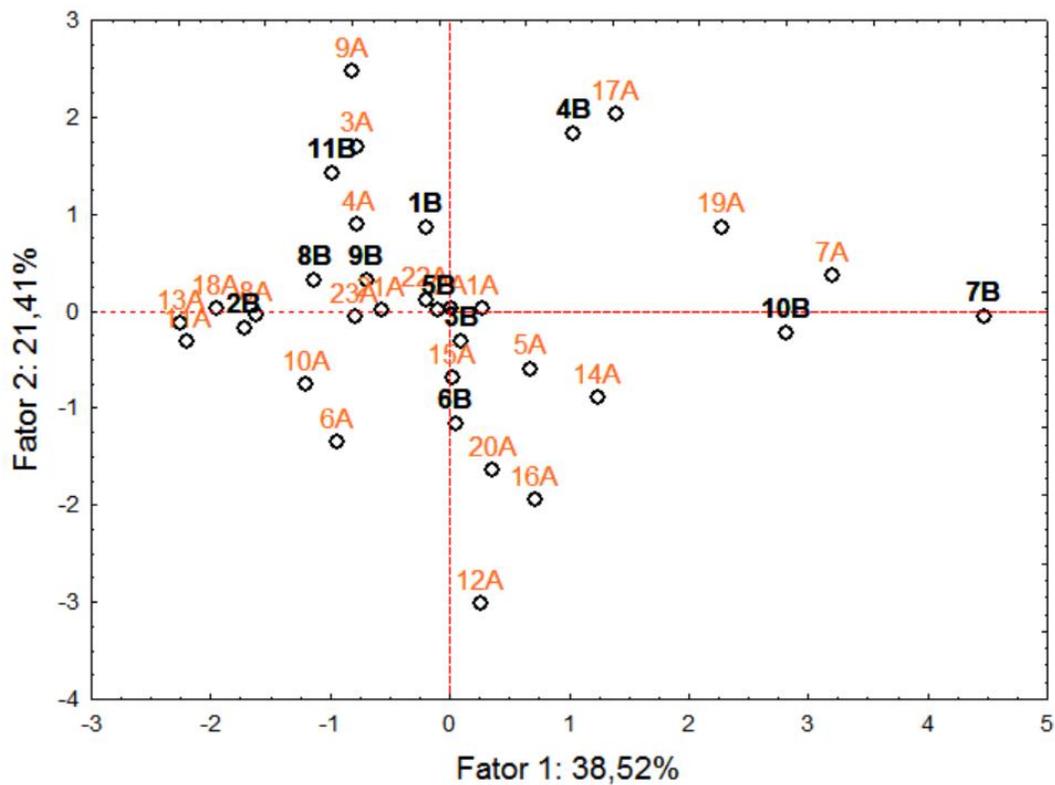
**Figura 17:** Gráfico das variáveis Ca, Fe, Mg, Mn, Cu e Zn na ACP.

Pela Figura 18 observa-se uma aproximação de todas as amostras produzidas em Prudentópolis no eixo positivo de Y (fator 2) e um segundo grupo de amostras, produzidas em Irati, no eixo positivo de X (fator 1). Observa-se também que amostras oriundas tanto de Ivaí quanto de Guamiranga estão distribuídas em quadrantes bem distintos, indicando perfis minerais completamente diferentes entre si. As demais localidades possuem poucas amostras dificultando qualquer tipo de conclusão com relação a origem do milho e o teor metálico contido nas farinhas.



**Figura 18:** Gráfico das amostras de farinhas de milho apontando os locais de produção.

A Figura 19 apresenta a mesma ACP referente a distribuição das amostras, no entanto, diferenciando desta vez a farinhas brancas das amarelas. Observa-se que a maioria das amostras de farinhas brancas estão em torno do eixo Y e em valores positivos de Y (fator 2), apontando uma correlação positiva com os metais Ca, Mg e Zn (Figura 17).



**Figura 19:** Gráfico das amostras de farinhas de milho apontando as farinhas brancas e amarelas na ACP.

Avaliando simultaneamente as Figuras 17 e 19, observa-se que as farinhas localizadas no eixo positivo de X (pelo fator 1), isto é, as amostras 7B, 7A, 10B, 19A, 17A, 4B, 14A, 5A, 16A, 20A e 12A foram as que apresentaram as maiores concentrações de todos os metais determinados, enquanto que as demais farinhas, localizadas no eixo negativo de x (pelo fator 1), apresentaram menores teores metálicos.

## 6. CONCLUSÕES

Métodos validados são imprescindíveis para garantir a confiabilidade de uma análise durante um procedimento analítico. A metodologia desenvolvida e validada para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em farinhas de milho apresentou resultados satisfatórios quanto aos parâmetros estabelecidos para validação de métodos, podendo ser utilizado em análise de rotina para a determinação de diferentes metais em farinhas de milho. O tempo de digestão (1:30 h) foi muito menor em relação aos aplicados em processos de calcinação, que podem variar de 10 a 24 h. A eliminação de  $H_2O_2$  no preparo da amostra reduziu significativamente a introdução de contaminantes e a perda de analitos pela efervescência brusca do meio de digestão, e finalmente a sonicação do digerido em banho de ultrassom assegurou uma completa solubilização dos analitos e proporcionou a liberação dos íons metálicos da matriz da amostra.

Através da determinação dos íons metálicos em 34 amostras de farinhas de milho, pode-se observar que existe uma variação grande dos teores metálicos entre as diversas amostras, independente de serem brancas ou amarelas.

Utilizando-se Análise de Componentes Principais (ACP) aos dados experimentais, observou-se que algumas amostras se agruparam apresentando um perfil mineral parecido, sugerindo que há uma relação com o local de origem das mesmas, como ocorreu com as farinhas provenientes de Prudentópolis e Irati. Entretanto, outras farinhas provenientes de uma mesma região, como as de Ivaí e Guamiranga, apresentaram concentrações distintas, sugerindo que existem outros fatores que interferem no perfil mineral das mesmas, além da localização geográfica.

Com relação aos metais avaliados neste trabalho, observou-se que as farinhas de milho possuem sua maior contribuição nutricional para os minerais Mn, Fe e Cu, seguido do Mg e Zn, sendo o Ca o metal que menos contribui para a ingestão diária recomendável.

## 7. REFERÊNCIAS

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias de Milho). 2002. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br>. Acesso em: 07/08/2016.

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias de Milho). 2013/2014. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br>. Acesso em: 07/08/2016.

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias de Milho). 2015. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br>. Acesso em: 07/08/2016.

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias de Milho). 2016. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br>. Acesso em: 07/08/2016.

ALDRICH, S.R.; SCOTT, W.O.; LENG, E.R. **Modern corn production**. 2.ed. Champaign: A & L Publication, 371 p. 1982.

ALESSI, M. O.; RAUPP, D. S.; GARDINGO, J. R. **Caracterização do processamento da farinha de milho biju para o aproveitamento dos subprodutos**. Exatas Terra, v.9, n.2. p.31-39, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução RDC nº 269**. 2005. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_269\\_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3). Acesso em 20/08/2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução RE nº 899**. 2003. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 20/08/2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução RDC nº 344**. 2002. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0344\\_13\\_12\\_2002.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0344_13_12_2002.html). Acesso em 20/08/2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução CNNPA nº 12**. 1978. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12\\_78.pdf](http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12_78.pdf). Acesso em 20/08/2016.

AKHTER, P.; MOHAMMAD, D.; ORFI, S. D.; AHMAD, N.; REHMAN, K. **Assessment of daily iron intake for the Pakistani population**. *Nutr. FoodSci.* v.35, p.109–117, 2005.

ALGÜL I.; KARA, D. **Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey**. *FoodChem.* v.157, p.70-76, 2014.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL**, 3rd rev. Edition. 1997.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL**, 19th Edition. 2012. APÊNDICE F.

ARAYA, M., OLIVARES, M. AND PIZARRO, F. **Copper in human health.** *Int. J. Environ. Health.* v.1, p.608–620. 2007.

BAE, Y. J.; CHOI, M. K. **Magnesium intake and its relevance with antioxidant capacity in Korean adults.** *Biol. Trace Elem. Res.* v. 143, p.213–225, 2011.

BASTOS, E. **Guia para o cultivo de milho.** São Paulo: Editora Ícone, 190p. 1987.

BEINNER, M. A.; LAMOUNIER, J. A. **Recent experience with fortification of foods and beverages with iron for the control of iron-deficiency anemia in Brazilian children.** *J. Food Nutr. Bull.* v. 24, p.268–274, 2003.

BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; FILHO, E. R. P.; LIMA-PALLONE, J. A. **Avaliação do teor de ferro e zinco e composição centesimal de farinhas de trigo e milho enriquecidas.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* v. 43, n. 4, out./dez., 2007.

BORNHORST, J.; EBERT, F.; HARTWIG, A.; MICHALKE, B.; SCHWERDTLE, T. **Manganese inhibits poly(ADP-ribosylation) in human cells: a possible mechanism behind manganese induced toxicity?** *J. Environ. Monitor.* 12: p.2062–2069, 2010.

BOUDJOUK, P.; J.. **Synthesis with ultrasonic waves.** *Chem. Educ.* v. 63, p. 427. 1986.

BRITO, N. M; AMARANTE, J. O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão.** *Pesticidas*. 13(dez/jan):129-46. 2003.

CALLEGARO, M.G.K.; DUTRA, C.B.; HUBER, L.S.; BECKER, LARISSA VARGAS; ROSA, C.S.; KUBOTA, E.H.; HECKTHEUR, L.H. **Determinação da fibra alimentar insolúvel, solúvel e total de produtos derivados do milho.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.2, p.271-274, 2005.

CHRISTIAN, G. D.; DASGUPTA, P. K.; SCHUG, K. A. **Analytical Chemistry.** Wiley. 5ed. 840. 840p.1994.

CIOBANU, C.; ŞLENCU, B.G.; CUCIUREANU, R. **FAAS determination of cadmium and lead content in foodstuffs from north-eastern Romanian Market.** *Studia Universitatis "Vasile Goldiş", Seria Ştiinţele Vieţii*. v.23, n.1, p.33-38, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 08/10/2016.

CORREIA, F. O. **Otimização de métodos analíticos para determinação de elementos essenciais e não essenciais em farinha de mandioca, trigo e milho consumida na cidade de Aracaju/SE.** Universidade Federal de Sergipe. 96p. 2014.

DUARTE, J. O. **Cultivo do milho: importância econômica.** Sete Lagoas: CNPMS - EMBRAPA Milho e Sorgo. 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2002. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em: 07/08/2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em: 07/08/2016.

ERIKSON, K.M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. **Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate**. *Pharmacol. Therapeut.* 113: p.369–377, 2007.

FATOKI, O.S. **Levels of Na, K, Ca and Mg in Infant Formulae and in Corn-Flour Infant Feeds**. *Food Chemistry*. v.37, p.269-273, 1990.

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

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 576 p. 2007.

FREITAS, P. C.; CARVALHO, R. M.; SILVA, J. S. A.; PRADO, T.; DUARTE, E. R.; FRESCURA, V. L. A.; CHAVES, E. S. **Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: uma comparação com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**. *Quím. Nova*. vol.38, n.4, p.570-574. 2015.

GALLUS, S.; FOSCHI, R.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; FRANCESCHI, S.; MONTELLA, M.V.; RAMAZZOTTI, V.; TAVANI, A.; DAL MASO, L.; LA VECCHIA, C. **Dietary zinc and prostate cancer risk: a case-control study from Italy.** *Eur. Urol.* 52: p.1052–1056, 2007.

GIACOMELLI, D.; MONEGO, B.; DELAGUSTIN, M. G.; BORBA, M. M.; RICALDE, S. R.; FACCO, E. M. P.; SIVIERO, J. **Composição nutricional das farinhas de milho pré-cozida, moída à pedra e da preparação culinária "polenta".** *Alim. Nutr., Araraquara.* v. 23, n. 3, p. 415-420, jul./set. 2012.

GOOGLE IMAGENS. 2016. Disponível em: <https://images.google.com/>. Acesso em: 10/2016.

GREENE, W. W. **Minerals list. General discussion of minerals.** 2000. Disponível em: <http://www.dcnutrition.com/minerals>. Acesso em: 07/08/2016.

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

HARIRI, E.; ABBOUD, M. I.; DEMIRDJIAN, S.; KORFALI, S.; MROUEH, M.; TALEB, R. **Carcinogenic and neurotoxic risks of acrylamide and heavy metals from potato and corn chips consumed by the Lebanese population.** *Journal of Food Composition and Analysis.* v.42, p.91–97, 2015.

HOENIG, M.; KERSABIEC, A. M. **Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status.** *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* vol. 51, Issue 11, September 1996, p.1297-1307.1996.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, DPE, DEAGRO. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2009. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 07/08/2016.

ICH (International Conference on Harmonisation). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/96), 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE (Estados Unidos da América). **Dietary supplement fact sheet: Magnesium**. Disponível em: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/Magnesium-HealthProfessional>. 2013. Acesso em: 07/08/2016.

KUO, Y. M., SU, T., ATTIEH Z., SYED, B. A., MCKIE, A. T., ANDERSON, G. J., GITSCHIER, J. AND VULPE, C. D. **Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex linked anaemia mouse**. *Int. J. Gastroenterol. Hepatol.* p.201–206. 2004.

LAJUNEN, L. H. J.; PERÄMÄKI, P. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**. *The Royal Society of Chemistry*. 2nd Edition, 342p. 2004.

LIFE EXTENSION FOUNDATION FOR LONGER LIFE. Advanced health and life extension. **Zinc in health and nutrition**. Disponível em: <http://www.advance-health.com/zinc/html>. 2013. Acesso em: 07/08/2016.

MATIOLI, G.; VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A. **Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia da qualidade.** *Acta Scientiarum Health Sci.* 16(2):357-64. 2004.

MIZUKOSHI, Y., NAKAMURA, H., BANDOW, H., MAEDA, Y., NAGATA, Y., 1999. **Sonolysis of organic liquid: effect of vapor pressure and evaporation rate.** *Ultrason. Sonochem.* 6, 203–209.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C.. **Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 3, p. 344-348, 1999.

NATA (National Association of Testing Authorities). **Guidelines for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods.** Australia, 2012.

NATURDATA. **Zea mays Linnaeus.** 2016. Disponível em : <http://naturdata.com/Zea-mays-5335.htm>. Acesso em 10/08/2016.

OHIO STATE UNIVERSITY. 2013. **Ohio State University extension fact sheet: Iron.** Disponível em: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/5000/5559.html>. Acesso em: 10/10/2016.

PAES, M. C. D. **Manipulação da composição química do milho: impacto na indústria e na saúde humana.** 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em:

<[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/milho/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/milho/index.htm)>.

Acesso

em: 10/110/2016.

PAESANO, R., BERLUTTI, F., PIETROPAOLI, M., PANTANELLA, F., PACIFICI, E., GOOLSBEE W. AND VALENTI, P. **Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron deficiency and iron deficiency anemia in pregnant women.** *Biometals*. p.411–417. 2010.

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.

SANTOS, E. E.; LAURIA, D. C.; PORTO DA SILVEIRA, C. L. **Assessment of daily intake of trace elements due to consumption of foodstuffs by adult inhabitants of Rio de Janeiro city.** *Science of the Total Environment*. v.327. n.1-3 p.69–79, 2004.

SANTOS, H. M.; LODEIRO, C.; CAPELO-MARTINEZ, J. L. **O poder do ultra-som.** In: *Ultra-som em química: aplicação analítica*. Wiley. p.1-16. 2009.

SANTOS, A. M. P.; LEAO, D. J.; SANTOS, L. O. **Homogeneity study of a corn flour laboratory reference material candidate for inorganic analysis.** *Food Chemistry*. JCR v. 178, p. 287-291. 2015.

SCHWANZ, T. G.; MOHR, S. **Determinação de bifenilos policlorados em milho através de extração em fase sólida seguida de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.** *Química Nova*. v.35, n.3, p.553-558, 2012.

SOETAN, K. O. Olaiya, C. O. and Oyewole, O. E. **The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: a review.** *Afr. J. Food Sci.* 4: p.200–222, 2010.

STIPANUK, M. H.; CAUDILL, M. A. **Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition.** 3ª Edição. Philadelphia: Elsevier Saundre Publishing, 2012.

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

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

SOUSA, R. A.; CAMPOS, N. S.; ORLANDO, R. **Preparação de amostras para análise elementar.** *Apostila de apoio.* Universidade Federal de Juiz de Fora. 17p. 2015.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** 4 ed. revisada e ampliada. Campinas, SP: UNICAMP, 2011. Disponível em: [http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada). Acesso em 01/10/2016.

TUPE, R.; CHIPLONKAR, S.A. **Diet patterns of lactovegetarian adolescent girls: need for devising recipes with high zinc bioavailability.** *Nutrition.* 26: p.390–398, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIV. 2000.

<http://www.pharmaceuticalonline.com/doc/united-states-pharmacopoeia-xxiv>.

Acesso em: 10/10/2016.

VALENTINI S. R, SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. **Validação de métodos analíticos.** *Arq Mudi*.v.1. 2ed .p.26-31.2007.

VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C. B. **Modern Methods for Trace Element Determination.** John Wiley & Sons Ltd. 330p. 1993.