UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANIÉLEN DOS SANTOS SILVA

Desenvolvimento de método analítico usando solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio auxiliado por energia de ultrassom em amostras de peixes para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn por FAAS

JEQUIÉ-BA
MAIO/2017

DANIÉLEN DOS SANTOS SILVA

Desenvolvimento de método analítico usando solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio auxiliado por energia de ultrassom em amostras de peixes para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn por FAAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Profº Dr. Marcos de Almeida Bezerra

JEQUIÉ-BA
MAIO/2017

S586d Silva, Daniélen dos Santos.
Desenvolvimento de método analítico usando solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio auxiliado por energia de ultrassomem amostras de peixes para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn por FAAS / Daniélen dos Santos Silva.- Jequié, 2017.
76f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra)

1.Solubilização alcalina 2.TMAH 3.Filé de Peixe 4.Metais 5.Planejamento Doehlert 6.Desejabilidade global I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 543.062

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006
Programa de Pós-Graduação em Química

Daniélen dos Santos Silvas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **29/05/2017.**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UFBA, Salvador-BA, 2006)
(Orientador)

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes (UFBA, Salvador-BA, 2011)

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos (UFBA, Salvador-BA, 2004)

Rua José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho
CEP: 45.208-091 - Jequié – Bahia
Telefone: (73) 3528-9630 Email: ppgquimica@uesb.edu.br

Dedico este trabalho a minha família,
que sempre acreditou em meu
sucesso e aos meus amigos e
mestres que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares que sempre acreditam em meu potencial e me incentivaram a crescer. Em especial minha mãe SIMONE, exemplo de força e determinação e ao meu esposo FERNANDO que compreendeu minhas ausências.

As minhas amigas JUCIANE E ELIVANA confidentes e válvula de escape e ao meu amigo ANTONIO CARLOS, companheiro de todas as horas. Sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao meu professor e orientador MARCOS DE ALMEIDA BEZERRA pela oportunidade, paciência e dedicação. Só tenho a agradecê-lo por ter podido desenvolver este trabalho com o senhor que é exemplo de professor e de ser humano.

Aos AMIGOS E COLEGAS DO LQA, em especial GISSELE, UILLIAN e JUCÉLIA pelo auxílio, pelas orientações, apoio e companhia durante todo meu trabalho de pesquisa, sou extremamente grata a vocês.

Ao professor WALTER NEI e a ALTEMAR pelo auxílio e incentivo para que eu terminasse meu trabalho de pesquisa.

Aos meus COLEGAS DE TURMA pelos bons momentos que vivemos juntos em todos os dias de aula, por podermos dividir as dificuldades e especialmente as alegrias de nos encontrarmos toda segunda-feira.

Em nome dos professores DJALMA e CLEBER agradeço aos docentes do Programa de Pós-graduação em Química pela oportunidade de aprender e me desenvolver profissionalmente. A CAPES pela bolsa concedida.

E a TODOS que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste mestrado.

"Dizem que a vida é para quem sabe viver,
mas ninguém nasce pronto. A vida é
para quem é corajoso o suficiente
para se arriscar e humilde o
bastante para aprender."

Clarice Lispector

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental dos Planejamentos Fatoriais de dois níveis com (a) duas e (b) três variáveis.[34] 26

Figura 2. Desenho do Planejamento composto central com (a) duas variáveis (b) três variáveis. 27

Figura 3. Obtenção do planejamento Box Benhken a partir do planejamento fatorial 3^3.[39] ... 28

Figura 4. Representação geométrica do planejamento Doehlert para duas variáveis.[29] 29

Figura 5. Planejamentos Doehlert para três variáveis originados por deferentes projeções planas do cubo octaedro 30

Figura 6. Fórmula estrutural do hidróxido de tetrametilamônio. 33

Figura 7. Sistema de solubilização alcalina com banho de ultrassom 42

Figura 8. Digestão ácida em bloco digestor utilizando "dedo frio". 42

Figura 9. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis tempo de sonicação e temperatura do banho de ultrassom. 47

Figura 10. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis temperatura do banho de ultrassom e volume de TMAH. 48

Figura 11. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis tempo de sonicação e volume de TMAH. 49

Figura 12. Perfis das desejabilidades individuais para Fe, Zn, Ca, Mg e perfil de desejabilidade global. 50

Figura 13. Mix de peixes digeridos nas condições propostas pela matriz Doehlert. 52

Figura 14. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis relacionado as variáveis volume de TMAH e tempo de sonicação do teste de turbidimetria. 53

Figura 15. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis tempo de sonicação e temperatura do teste de turbidimetria. 54

Figura 16. Curvas analíticas dos metais Ca (a), Fe (b), Mg (c) e Zn (d) obtidas nos meios aquoso e TMAH. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz Doehlert para quatro variáveis. 31

Tabela 2. Matriz Doehlert para cinco variáveis. 31

Tabela 3. Parâmetros do Espectrômetro de absorção atômica com chama..... 39

Tabela 4. Planejamento Doehlert aplicado na otimização das variáveis envolvidas na solubilização alcalina com TMAH de filé de peixes para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn. 46

Tabela 5. Comparação entre os intervalos ótimos das variáveis avaliados através das respostas recuperação e turbidez. 55

Tabela 6. Análise de variância para o modelo quadrático ajustado à resposta desejabilidade global em nível de confiança de 95%. 56

Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas para o Ca, Fe, Mg e Zn obtidos obtidas nos meios aquoso e TMAH. 59

Tabela 8. Parâmetros de validação para o método de solubilização alcalina com TMAH proposto. 61

Tabela 9. Comparação entre as concentrações dos analitos utilizando solubilização alcalina e ácida. 62

Tabela 10. Determinação de Fe e Zn em material de referência certificado tratadas com TMAH auxiliado por ultrassom. 63

Tabela 11. Composição mineral das amostras de diferentes regiões pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA: Análise de variância;

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ETAAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, do inglês Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry);

FAAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*;

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**,** do inglês *Food and Agriculture Organization***;**

HCL: Lâmpada de Cátodo Oco, do inglês *Hollow Cathode Lamp*;

ICP OES: Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy;*

ICP-MS: Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*;

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;

LD: Limite de Detecção;

LQ: Limite de Quantificação;

MRS: Metodologia de Superfície de Resposta;

OMS: Organização Mundial de Saúde;

PTFE: Politetrafluoretileno;

RIISPOA: Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal**;**

RSD: Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*;

TACO: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos;

TMAH: Hidróxido de Tetrametilamônio, do inglês *Tetramethylammonium Hydroxide*.

Desenvolvimento de método analítico usando solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio auxiliado por energia de ultrassom em amostras de peixes para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn por FAAS

Autor: Daniélen dos Santos Silva
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

RESUMO: Um métodos de solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) auxiliado por energia de ultrassom foi otimizado utilizando planejamento experimental Doehlert. As variáveis estudadas foram volume de TMAH, tempo de sonicação e temperatura do banho de sonicação, os quais apresentaram valores ótimos de 620 µL, 25 minutos e 46 °C, respectivamente. Amostras de filé de peixes foram solubilizadas com TMAH para posterior determinação por espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS). Os limites de quantificação para Ca, Mg, Fe e Zn foram 56, 107, 23 e 2,9 $\mu g\ g^{-1}$, respectivamente. A exatidão foi avaliada comparando os resultados obtidos a partir da análise das amostras tratadas pelo método proposto e por digestão em bloco digestor. Adicionalmente, a precisão para Fe e Zn foi avaliada por análise das amostras certificadas do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá, Tort-3 (hepatopâncreas de lagosta), Dolt-4 (fígado de peixe) e ERM-CE 278 (tecido de mexilhão). Não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos com um nível de confiança de 95% quando os resultados foram avaliados pela aplicação do teste t.

Palavras-chave: solubilização alcalina, TMAH, filé de peixe, metais, planejamento Doehlert, desejabilidade global

Development of analytical method alkaline digestion using tetramethylammonium hydroxide with ultrasonic energy for determination of metals in fish samples

Autor: Daniélen dos Santos Silva
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

ABSTRACT: Doehlert design and desirability function were used in the optimization of an ultrasound assisted dissolution method of fish fillet samples with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) for the determination of Ca, Fe, Mg and Zn by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The variables studied were the volume of TMAH, the sonication time and the bath temperature. The optimal values found were 620 µL, 25 min and 46 ° C respectively. The quantification limits for Ca, Mg, Fe and Zn were 56, 107, 23 and 2,9 $\mu g\ g^{-1}$, respectively. Accuracy was evaluated by comparing the results generated from the analysis of the samples treated by the proposed method and by wet digestion. Additionally, accuracy for Fe and Zn was assessed by analysis of the certified samples provided by the National Research Council of Canada, Tort-3 (Lobster hepatopancreas), Dolt-4 (Fish liver) and ERM-CE 278 (Mussel tissue). There were no significant differences between the results obtained at a 95% confidence level when results were evaluated by t-test application.

Keywords: alkaline solubilization, TMAH, fish fillet, metals, Doehlert design, overall desirability

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **15**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **17**

2.1 A IMPORTÂNCIA DOS METAIS NA NUTRIÇÃO HUMANA **18**
2.2 ASPECTOS GERAIS DOS PEIXES NA ALIMENTAÇÃO **22**
2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO **24**
2.3.1 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA 24
2.3.2 PLANEJAMENTOS FATORIAIS 25
2.3.3 PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL 27
2.3.4 PLANEJAMENTO BOX BEHNKEN 28
2.3.5 PLANEJAMENTO DOEHLERT 28
2.4 PREPARO DE AMOSTRAS **32**
2.4.1 DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA 32
2.4.2 SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA COM TMAH 33
2.4.3 O USO DE ULTRASSOM NO TRATAMENTO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE METAIS 35

3. OBJETIVOS **36**

3.1 OBJETIVO GERAL **37**
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **37**

4. PARTE EXPERIMENTAL **38**

4.1 INSTRUMENTAÇÃO **39**
4.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS **39**
4.3 REAGENTES **40**
4.4 SOLUÇÕES **40**
4.5 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS **40**
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS **41**
4.7 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA **41**
4.8 DIGESTÃO ÁCIDA **42**
4.9 MEDIDAS DE TURBIDEZ DAS AMOSTRAS **43**
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA **43**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **44**

5.1 SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA COM TMAH ASSISTIDA POR ENERGIA DE ULTRASSOM **45**

5.2 MEDIDAS DE TURBIDEZ **51**

5.3 AVALIAÇÃO DO MODELO PROPOSTO **55**

5.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA **56**

5.4.1 LINEARIDADE 56

5.4.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ) 60

5.4.3 PRECISÃO 60

5.4.4 EXATIDÃO 61

5.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NAS AMOSTRAS DE PEIXES **64**

6. CONCLUSÕES **66**

7. PERSPECTIVAS **67**

8. REFERÊNCIAS **68**

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são alimentos ricos em nutrientes e proteínas com baixo teor de gorduras e propriedades que estão associadas à redução do risco de doenças do coração. Para conseguir esses benefícios a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda seu consumo ao menos duas vezes por semana e isto tem influenciado no aumento da ingestão de peixes no Brasil e no mundo.[1,2]

Dentre os minerais encontrados nos peixes podemos destacar o Ca, Fe, Mg e Zn que são essenciais à saúde humana por apresentarem funções químicas e biológicas. O bom funcionamento do organismo está diretamente relacionado com o consumo destes e de outros catorze elementos reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde, pois esses não são produzidos pelo corpo humano.[3,4]

No entanto, o aumento crescente do consumo de peixes no Brasil tem gerado uma preocupação com relação à quantidade de metais, essenciais ou não, ingeridos indiretamente, já que os peixes podem ser bioacumuladores. E tanto o excesso quanto a carência de minerais podem causar danos a saúde dos seres humanos.[5]

A determinação de metais, na Química Analítica, geralmente é feita através de técnicas espectrométricas. Essas técnicas requerem que as amostras passem por um processo de digestão durante seu pré-tratamento, que é o responsável por decompor a matéria orgânica e disponibilizar os analitos em solução, para só então poderem ser determinados. Há relatos na literatura de que esta fase é responsável por 30% dos erros de análise.[6,7]

Muitas são as técnicas de digestão que podem ser utilizadas, entretanto, a escolha vai depender do tipo de amostra e dos analitos que se deseja determinar. Dentre estas técnicas a mais utilizada é a digestão por via úmida que pode ocorrer em sistemas aberto (bloco digestor) ou fechado (utilizando bombas de politetrafluoretileno - PTFE).[6,8]

No entanto, um novo método de solubilização de amostras tem sido bastante estudado com o intuito de tornar os processos de solubilização de amostras mais rápidos e seguros. Nela se utiliza um reagente chamado hidróxido de tretametilamônio — uma base forte de pH entre 13,4 e 14,7, normalmente comercializada na forma de solução aquosa ou metanólica 25% v/v.[9]

A utilização de energia ultrassônica no auxilio de técnicas de pré-tratamento de amostras também vem sendo investigada pelo fato delas acelerarem os

processos de decomposição sem necessitar de aquecimento. Isso ocorre graças ao chamado efeito cavitacional gerado pelas ondas mecânicas do ultrassom, que possui frequência entre 16 KHz a 1 MHz, que são capazes de provocar colapsos nas cavidades formadas nos líquidos e sólidos devido as alternâncias entre as zonas de alta e baixa pressão, criando ciclos de compressão e expansão.[10,11]

A solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) auxiliada por utrassom se tornou uma alternativa frente às técnicas de digestão convencionais que utiliza ácidos oxidantes, pelo fato de possuírem maior rapidez na dissolução das amostras biológicas, se comparados a digestão ácida, além de impedir as perdas de elementos voláteis já que dispensa aquecimento.[12,13]

Amostras de material biológico, unhas, cabelos, frangos, carne. já foram tratadas por sulibilização alcalina com TMAH auxiliada por ultrassom e têm apresentado equivalência estatística na quantificação dos analitos estudados quando comparados com metodologias convencionais. Deste modo pode-se inferir que este método é eficiente para o pré-tratamento de amostra.[9]

Neste trabalho otimizou-se um método de sulibilização alcalina de amostras de filé de peixes com TMAH utilizando um planejamento experimental Doehlert para três variáveis no qual foram realizados treze experimentos em triplicata. Deste modo, foi possível desenvolver um método analítico de pré-tratamento de amostras utilizando solubilização alcalina com TMAH com o auxílio de energia de ultrassom para determinação dos metais Ca, Fe, Mg e Zn em amostras de peixes por espectrometria da absorção atômica com chama (FAAS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA DOS METAIS NA NUTRIÇÃO HUMANA

Os minerais são substâncias essenciais na nutrição humana, pois atuam diretamente nas funções químicas e biológicas. Eles são responsáveis, dentre outras coisas, pelo regulamento do metabolismo enzimático, do metabolismo ácido-básico e da pressão osmótica, além de estar presente na composição de tecidos orgânicos, dentre outras.[3,4]

A OMS reconhece hoje dezoito metais que estão diretamente relacionados ao bom funcionamento do organismo, no entanto, eles não são produzidos pelo corpo humano, normalmente eles são obtidos através dos alimentos consumidos e por este motivo é tão importante possuir uma dieta balanceada.[4,14]

Os minerais são subdivididos em quatro grupos: eletrólitos, macronutrientes, micronutrientes e elementos ultratraço. Os principais eletrólitos são: sódio, potássio e cloro, responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico. O principal elemento ultratraço é o flúor, todavia, sua atividade metabólica ainda não está totalmente definida.[3]

Os macro e micronutrientes são substâncias que devem ser ingeridos em maior e menor quantidade, pelo indivíduo, respectivamente, e possuem atividades específicas e essenciais. Entre os macronutrientes pode-se destacar: cálcio, magnésio, fósforo e enxofre. Já os micronutrientes destacam-se: ferro, cromo, iodo, zinco e manganês.[3]

Estes elementos químicos, nos organismos, não ficam isolados na sua forma elementar ou iônica, normalmente eles se ligam a compostos orgânicos através de ligação covalente gerando assim: as proteínas, enzimas, hormônios e aminoácidos, que também são conhecidos como compostos quelatos.[4]

Uma dieta diversificada e rica em frutas, verduras, legumes, carne vermelha, de frango ou peixes contribui diretamente com a quantidade de nutrientes absorvidos pelo indivíduo que os consomem e consequentemente, melhora o funcionamento de seu organismo.[15]

Neste trabalho de pesquisa foram estudados os macronutrientes cálcio e magnésio, e os micronutrientes ferro e zinco, em amostras de filé de peixe fresco. O cálcio pode ser encontrado, em quantidades apreciáveis, principalmente no leite e derivados, na abóbora, espinafre e agrião. O magnésio é encontrado em quantidades significativas na castanha, gérmen de trigo, grão-de-bico e soja. Já o

ferro é encontrado principalmente em carnes, fígado de boi, feijão preto e açaí. O zinco, por sua vez, pode ser obtido na carne de porco e bovina, no leite, na soja e no fígado bovino.[3,16]

O cálcio (Ca) é classificado com um metal alcalino terroso, possui número atômico 20 e massa atômica 40,07 g mol^{-1}, é o quinto elemento mais abundante na crosta terrestre correspondendo em peso a 4,66%. Ele pode ser encontrado na natureza principalmente, como um dos principais constituintes de vários minerais. O seu estado de oxidação mais comum é +2.[17]

Nos seres humanos, o cálcio está presente majoritariamente nos ossos, tornando-os fortes e resistentes. Mas também possui atividade na coagulação sanguínea, auxilia na liberação de neurotransmissores no cérebro e no sistema nervoso, ajuda a metabolizar o ferro. A recomendação diária para ingestão de cálcio é de 1000 mg, para a população adulta, todavia, estudos demonstraram que no Brasil a ingestão é de aproximadamente 300 à 500 mg ao dia.[4,18]

Além do baixo consumo, a população brasileira sofre outros fatores que interferem no aproveitamento do cálcio, que é o excesso de sódio na dieta e o déficit de vitamina D. Já se sabe que a carência de cálcio está diretamente relacionada a doenças dos ossos como: retardamento do crescimento, raquitismo e osteoporose. Entretanto, carências moderadas de cálcio podem causar sintomas como: formigamento, agulhadas, entorpecimento dos membros e contrações musculares.[4]

No entanto, o aumento do cálcio no sangue pode desencadear sintomas como: frequente necessidade de urinar, formação de cálculos renais, perda do apetite, fraqueza muscular, sonolência, palpitações. Ou ainda ser indicativo de algumas doenças graves como: câncer com metástase óssea, hiperparatireoidismo e insuficiência renal.[4]

O magnésio (Mg) é um metal alcalino terroso de número atômico 12 e massa atômica 24,30 g mol^{-1}, sendo o sexto elemento mais abundante da crosta terrestre que corresponde a aproximadamente 2,76% em peso. Um dos principais locais onde este elemento pode ser encontrado, na natureza, é no mar na forma de sais dissolvidos.[17]

No corpo humano o magnésio é encontrado em várias partes, em sua maioria, cerca de 60%, se apresenta no esqueleto, 27% estão nos músculos, de 6 a 7% se apresentam em outras células e uma quantidade muito reduzida, no espaço

extracelular. Isso demonstra as inúmeras aplicações desse macronutriente para os seres humanos.[18]

Normalmente é encontrado na forma iônica Mg^{2+} e é de grande importância para inúmeras reações metabólicas essenciais como: transporte de íons, síntese de outras moléculas essenciais, cofator de inúmeras enzimas e produção de energia. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que a ingestão diária de magnésio seja de 260 mg/dia para adultos.[19]

Este mineral é bastante abundante em alimentos de origem vegetal e animal, sendo suas principais fontes os cereais (trigo, aveia, arroz, farelos) e as leguminosas (feijão, soja e ervilha seca.), deste modo, indivíduos sadios que consomem uma dieta balanceada dificilmente terão déficit deste nutriente. Todavia, algumas pesquisas apontam que em algumas regiões do Brasil a ingestão de magnésio fica abaixo do recomendado, e em outras regiões se mantém num nível limítrofe.[20,21]

A falta deste macronutriente pode causar nos seres humanos sintomas como fraqueza muscular, letargia, depressão, irritação e, em casos extremos, ataques cardíacos e anorexia. A contaminação por magnésio é conhecido como hipermagnesemia e era comumente visto quando o sulfato de magnésio era muito usado como anticonvulsivante ou anestésico, hoje se restringe a pacientes com insuficiência renal quando tratados com sais de magnésio ou misturas de antiácidos.[22]

A depender do grau de contaminação os sintomas são diferentes apresentando desde tendência a hipotensão arterial, vasodilatação periférica, rubor facial, sensação de calor, sede, náuseas e vômitos até sintomas mais graves como: paralisia muscular, coma, apnéia e parada cardíaca.[4]

Ferro (Fe) é um metal de transição de número atômico 26 e massa atômica 55,84 g mol^{-1}, seus estados de oxidação mais importantes são +2 e +3, na forma dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+}, respectivamente. Este é o quarto elemento mais abundante em peso da crosta terrestre, correspondendo a aproximadamente 6% em peso.[17]

No corpo humano o ferro é essencial para formação das células vermelhas (hemoglobina) e de algumas enzimas e é importante no fornecimento de oxigênio para as células, além de ser importante para o desenvolvimento correto de várias funções biológicas. O baixo consumo de ferro pode afetar o desempenho intelectual, baixar a resistência às doenças, afetar o controle de temperatura do corpo, diminuir as defesas imunitárias e principalmente, causar anemias graves.[3,4]

A recomendação de ferro na dieta humana é de 10 mg ao dia para homens e 18 mg ao dia para mulheres em idade fértil devido as perdas de sangue todo mês durante a mestruação. No entanto, no Brasil existe um grande problema relacionado com anemia privativa de ferro, devido à baixa biodisponiblidade nas dietas dos brasileiros. E para tentar sanar este problema, a legislação obriga adicionar ferro às farinhas de trigo e milho. E já se estuda, na área da engenharia genética, 'meios para aumentar a quantidade de ferro nos feijões.[20]

A administração oral de altas doses de ferro pode causar aos pacientes náuseas, cólicas abdominais e até diarréia. Já a intoxicação aguda pela ingestão de grandes quantidades de sais de ferro pode produzir num indivíduo gastrite necrosante grave, vômitos, hemorragia, diarréia e colapso circulatório.[23]

O zinco (Zn) tem número atômico 30 e massa atômica 65,40 g mol^{-1}, e é um metal de transição. Nos seres vivos ele é indispensável em aproximadamente 100 enzimas que realizam reações químicas vitais. Atua no crescimento, replicação celular, síntese de hormônios, maturação sexual, fertilidade e reprodução.[3,4]

Pesquisas realizadas no Brasil demonstram que boa parte da população possui deficiência de zinco. E isto pode desencadear atraso da maturidade sexual, déficit de crescimento, diminuição do apetite, diarréia crônica e até deficiência do sistema autoimune.[4,20]

Apesar de a contaminação por zinco ser rara ela pode dificultar a absorção do cobre, além de causar distúrbios gastrointestinais como: gosto metálico, náuseas, vômitos e dores abdominais. As formas de contaminação ocorrem normalmente por contato com resíduos de indústrias metalúrgicas.[24]

Este tipo de contaminação pode ocorrer nas hemodiálises, decorrente da liberação do zinco contido nos adesivos plásticos usados nas bobinas de diálise e do zinco existente nos tubos galvanizados destas mesmas máquinas. Nestas intercorrências crônicas, os pacientes apresentam anemia, febre e distúrbios do sistema nervoso central.[24]

A vida moderna tem levado a população a consumir alimentos industrializados altamente processados de baixo valor nutricional, deste modo, fazem-se necessárias atividades de educação alimentar, principalmente na infância, a fim de expor os benefícios de uma alimentação saudável e consequentemente, diminuir a carência de minerais reduzindo, assim, a incidência de doenças e sintomas

relacionados à deficiência de micro e macronutrientes encontrados abundantemente em alimentos naturais.

2.2 ASPECTOS GERAIS DOS PEIXES NA ALIMENTAÇÃO

Nos últimos anos notou-se que questões de saúde tem sido uma preocupação para a população mundial pelo fato de muitos problemas estarem diretamente relacionados aos hábitos alimentares, podendo destacar as doenças cardiovasculares. E isso nos leva a refletir o quanto uma dieta balanceada está diretamente relacionada com a saúde e o bem estar.[1,25]

Diante dessa preocupação existe a tendência de aumento na ingestão de alimentos menos processados e *in natura* como: frutas, hortaliças, verduras e proteínas magras, por exemplo, os peixes que são muito consumidos devido seu baixo teor de gordura em comparação com carnes vermelha e embutidos.[26,27]

Os peixes são altamente recomendados por serem alimentos ricos em proteínas, aminoácidos essenciais, macro e micronutrientes como: cálcio, fósforo e flúor e., são fontes de ácidos graxos insaturados essenciais (ômega-3) e vitaminas. Além de possuir alto valor nutricional está associado à redução de risco de doenças cardiovasculares.[1]

A OMS recomenda o consumo de peixes pelo menos duas vezes por semana a fim de evitar doenças cardiovasculares. Atualmente, a média de consumo de peixes anual do Brasil é de 9 Kg/pessoa, no entanto, ainda está abaixo do recomendado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) que é 12 Kg/pessoa/ano.[2]

Uma pesquisa sobre o consumo de peixes no Brasil, da Universidade de São Paulo juntamente com o Ministério da Saúde e outras instituições, divulgada em 2015, demonstra que região norte é a que possui maior consumo regular de peixes, destacando-se a Amazônia onde 93% da população analisada consume peixes pelo menos uma vez por semana.[1]

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), legitimado pelo decreto nº 30.691/1952, classifica os peixes em

três categorias: fresco, resfriado e congelado. Os peixes frescos são aqueles que não passam por nenhum processo de conservação a não ser a ação do gelo. Os resfriados o pescado acondicionado em gelo e mantido a temperatura entre -0,5 ºC a -0,2 ºC. Já os congelados são os peixes tratados por processos adequados de congelamento, no entanto a temperatura não pode ultrapassar –25 ºC.[28]

O crescente aumento do consumo de peixes no Brasil tem gerado preocupação em relação à quantidade de metais, essenciais ou não, consumidos pelos indivíduos, por esse motivo tem-se desenvolvido técnicas mais eficientes para determinação desses metais com a finalidade de obter informações nutricionais e controle de qualidade dos produtos prezando pela segurança alimentar.

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL MULTIVARIADO

O planejamento experimental multivariado tem ganhado destaque na otimização de processos analíticos, frente ao tão utilizado planejamento univariado, pois nele utiliza-se uma menor quantidade de experimentos, o que diminui tempo, trabalho e gastos com reagentes, além disso, é possível avaliar como a interação entre as variáveis interfere na resposta.[29]

Para entender o planejamento experimental primeiramente devemos definir alguns conceitos: a) os fatores são as variáveis que podemos alterar, por exemplo, a temperatura do sistema, o tempo de solubilização, entre outros b) os níveis são as variações numéricas dos fatores, exemplo, a temperatura de solubilização pode ser estudada em 50, 75 e 100 ºC, esses três valores são, portanto, os níveis em que o fator temperatura está variando e c) resposta é a variável resultante da variação dos fatores, por exemplo, o rendimento da reação.[30]

Antes de escolher o tipo de planejamento deve-se levar em consideração a quantidade de fatores que se deseja estudar, pois, a depender do planejamento uma quantidade muito grande de ensaios será proposta, por exemplo, num planejamento fatorial 2^7 vai requerer 128 ensaios o que o torna inviável uma vez que uma das vantagens do planejamento multivariado é obter a resposta adequada utilizando a menor quantidade de ensaios, nestes casos, devemos estudar apenas as variáveis que exercem maiores influências na resposta ou escolher outro planejamento.[31]

2.3.1 Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é a junção de técnicas estatísticas para modelagem de modelos empíricos, geralmente, com base no ajuste de uma função polinomial a um conjunto de dados com a finalidade de fazer previsões estatísticas. Essa metodologia surgiu na década de cinquenta e foi desenvolvida por Box e colaboradores.[30,38]

Este tipo de análise estatística tem sido muito utilizado na Química Analítica principalmente para encontrar as condições em que as variáveis produzem as melhores respostas desejadas, ou seja, na otimização de experimentos, que é demonstrada nos pontos críticos gerados na superfície de respostas através da

resolução matemática de um sistema de equações formado pela primeira derivada em relação a cada variável.[32]

A aplicação da MSR exige algumas etapas: (1) selecionar as variáveis independentes de efeitos mais significativos por meio de estudo de triagem e delimitação da região experimental; (2) escolha do planejamento experimental e execução dos experimentos de acordo com a matriz experimental do mesmo; (3) tratamento experimental dos resultados experimentais obtidos através do ajuste de uma função polinomial; (4) avaliação do modelo; (5) análise da possibilidade e necessidade de deslocamento do planejamento em direção região ótima; (6) obtenção dos valores ótimos para cada variável estudada.[38]

Para a aplicação da MSR deve-se utilizar matrizes experimentais em que todas as variáveis sejam estudadas em no mínimo três níveis, deste modo, os planejamentos experimentais que possuem a melhor distribuição de pontos experimentais são: fatorial de três níveis, Box-Behnken, composto central e Doehlert.[38]

2.3.2 Planejamentos Fatoriais

O planejamento fatorial é o planejamento mais simples, no qual é possível estudar todas as possíveis combinações entre os níveis dos fatores escolhidos. Este tipo de planejamento é bastante utilizado a fim de definir as variáveis significativas e suas interações frente à resposta a ser estudada.[33]

No planejamento de dois níveis, também chamado de fatorial 2^k, as variáveis são estudadas em dois níveis diferentes, por exemplo, se estudarmos a temperatura de solubilização podemos variá-la nos níveis 100 e 200 ºC, e o tempo de solubilização em 1 e 2 h, deste modo, as combinações seriam: (100 ºC, 1 h), (100 ºC, 2 h), (200 ºC, 1 h) e (200 ºC, 2 h).[31]

A Figura 1 demonstra geometricamente os possíveis experimentos a serem realizados em um fatorial de dois níveis com duas e três variáveis. Note que os valores estão codificados, ou seja, sinal (+) refere-se ao maior valor de um fator e o sinal (-) refere-se ao menor valor desse fator. Podemos também incluir um nível zero (0) como ponto central no qual todas as variáveis estão em seu valor médio.[34]

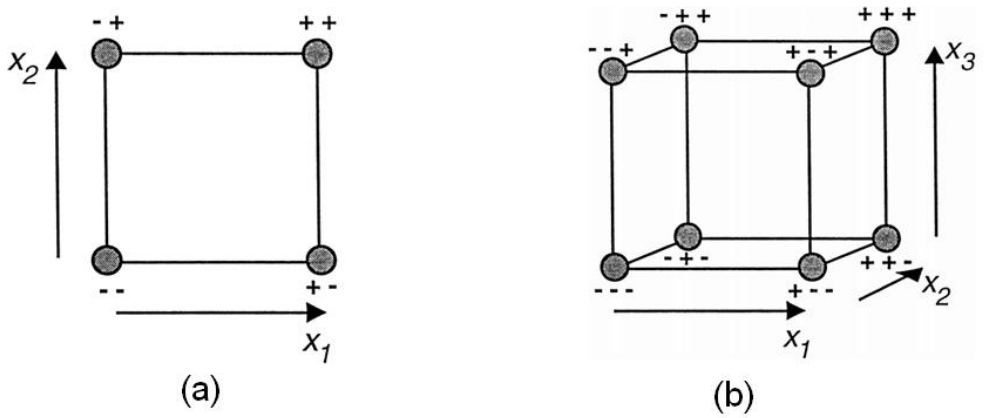


Figura 1. Desenho experimental dos Planejamentos Fatoriais de dois níveis com (a) duas e (b) três variáveis.[34]

Este tipo de planejamento não é adequado para a otimização de muitas variáveis, pois a quantidade de experimento é calculada através da expressão 2^k, onde k é o número de variáveis, deste modo o valor cresce exponencialmente e, portanto, quando estudamos quatro fatores, por exemplo, seria necessário fazer no mínimo dezesseis ensaios (2^4). Se a intenção é investigar uma quantidade maior de fatores é mais adequado a utilização de um planejamento fatorial fracionário.[31,35]

Para se obter um planejamento fatorial fracionário deve-se reduzir os pontos experimentais de um planejamento fatorial completo descartando algumas combinações, isso é possível, pois se os efeitos da interação dessas variáveis na resposta geralmente não são significativos então os ensaios não precisam ser realizados.[36]

No entanto, isso só ocorre por dois motivos: o primeiro é o fato do número de efeitos de interação muitas vezes têm valores pequenos e são destituídos de qualquer importância prática, o segundo, é que quando o número de variáveis aumenta, crescem as chances de uma ou mais variáveis não afetarem significativamente a resposta, por meio de efeitos principais ou por meio de efeitos de interação.[31,34]

Para determinar o número de experimentos (n) de um planejamento fatorial fracionário usamos a expressão $n = 2^{k-x}$, onde *k* é o número de fatores e *x* refere-se à redução de experimentos. Portanto, se trabalharmos com 2 fatores e se x for igual a 1 (um), o número de ensaios será a metade do que seria utilizado em um planejamento fatorial completo.[30,33]

2.3.3 Planejamento Composto Central

O planejamento composto central é mais antigo do que os planejamentos experimentais multivariados Box Behnken e Doehlert. Ele é construído pela união de três partes: o planejamento fatorial com variáveis normatizadas -1 e +1, o planejamento estrela (axial), ficando a uma distância α do seu centro e o ponto central.[30,33]

A Figura 2 apresenta a conformação geométrica do planejamento composto central no qual o planejamento fatorial é representado pelos pontos cheios (●), o planejamento estrela é representado pelos pontos vazios (○), e o ponto central, representado pelo quadrado (□). Vale lembrar que o ponto central pode ser repetido várias vezes, a fim de fornecer uma medida do erro puro e estimar a variância da resposta prevista. [37,38]

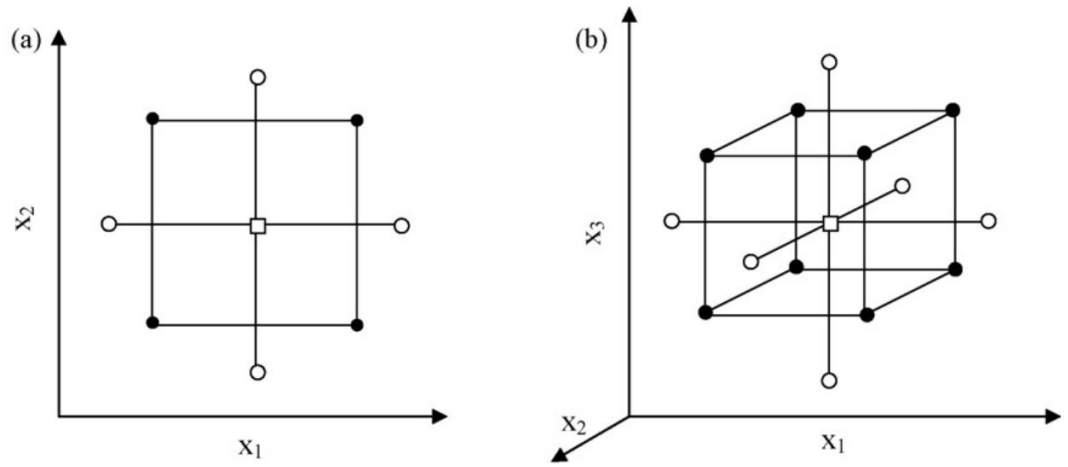


Figura 2. Desenho do Planejamento composto central com (a) duas variáveis (b) três variáveis.[38]

O número de experimentos (N) do planejamento composto central é determinado pela expressão: $N = k^2 + 2k + C_p$, onde k é o número de fatores e C_p é o número de réplicas do ponto central. O valor de α depende do número de fatores e é obtido através da equação $\alpha = 2^{(k-p)/4}$, para duas, três e quatro variáveis é respectivamente, 1,41; 1,68 e 2,00. Cada fator é estudado em cinco níveis (-α, -1, 0, +1, +α).[31,38]

2.3.4 Planejamento Box Behnken

O planejamento Box Behnken surgiu em 1960 a partir da subtração de alguns pontos do planejamento fatorial de três níveis original, conforme mostrado na Figura 3. Uma das grandes vantagens é quanto ao número de experimentos que torna o planejamento de baixo custo e rápido.[30,39]

O fato do planejamento Box Behnken não possibilitar que os fatores sejam estudados em nível superior e em nível inferior ao mesmo tempo pode ser considerado por alguns autores uma vantagem, já que essa condição máxima dificilmente possui efeito significativo na resposta, todavia, isso pode ser uma desvantagem, pois algumas vezes precisarmos avaliar os fatores em condições extremas.[39]

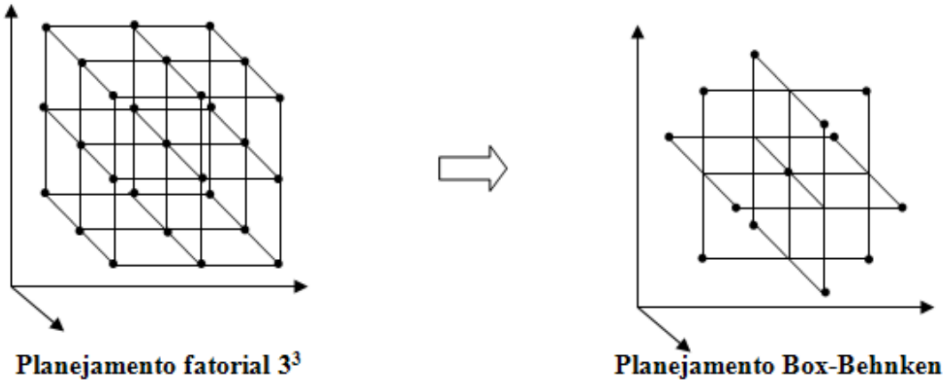


Figura 3. Obtenção do planejamento Box Benhken a partir do planejamento fatorial 3^3.[39]

Esse planejamento é aplicado quando se deseja estudar três ou mais fatores, em três níveis cada um (+1, 0, -1). O número de experimento do planejamento Box Behnken (N) é determinado pela equação: $N = k^2 - k + C_p$, onde k é o número de variáveis e Cp é o número de pontos centrais.[30,39]

2.3.5 Planejamento Doehlert

O planejamento experimental Doehlert ou simplesmente matriz Doehlert foi criado em 1970 por David Doehlert, no entanto, vem sendo bastante utilizado nas últimas décadas na otimização de experimentos em geral e especialmente na Química Analítica.[40,41]

São inúmeras as vantagens do planejamento Doehlert, dentre elas: ser facilmente aplicado as variáveis experimentais utilizando poucos ensaios, permitir a construção de planejamentos sequenciais em direção à resposta máxima e poder escolher os fatores que se deseja estudar em um número maior de níveis. A quantidade de experimentos (N) é determinado pela expressão $N = k^2 + k + C_p$, onde k é o número de fatores e C_p é o número de replicas do ponto central.[29,41]

Geometricamente o planejamento Doehlert possui pontos experimentais igualmente espaçados em círculos, esferas ou hiperesferas concêntricas, formando um hexágono quando trabalhamos com duas variáveis, conforme demonstrado na Figura 4. Este tipo de planejamento se destaca, dentre outros motivos, pelo menor número de experimentos em relação ao planejamento de superfície de resposta.[30,40]

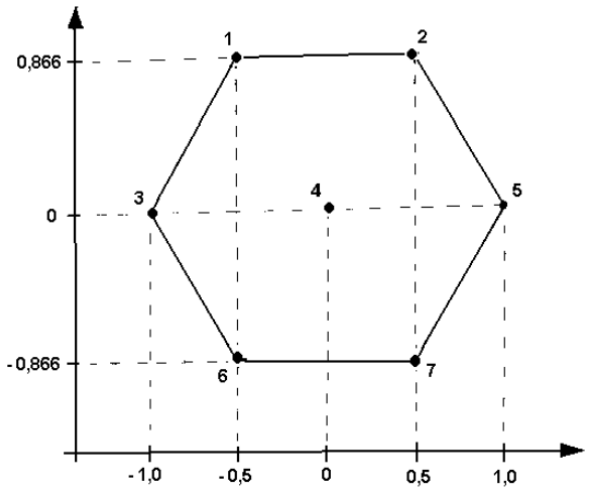


Figura 4. Representação geométrica do planejamento Doehlert para duas variáveis.[29]

O planejamento Doehlert possibilita o estudo das variáveis em níveis diferentes, ou seja, a variável representada no eixo x é investigada em cinco níveis (-1,0; -0,5; 0; 0,5; 1,0), enquanto a variável representada no eixo y é estudada em três níveis (-0,866; 0; 0,866). Deste modo, a variável mais significativa deve ser estudada com a maior quantidade de níveis para se obter mais informações.[30]

As figuras geométricas que orientam o planejamento Doehlert para três variáveis apresentam três conformações diferentes oriundas de um octaedro, conforme exposto na Figura 5, onde (a) é a distribuição de pontos obtidos projeção sobre uma face quadrada, (b) é a projeção sobre uma face triangular e (c) é a projeção sobre um vértice.

Uma grande vantagem do planejamento Doehlert, comparado com o Box-Behnken e o composto central é justamente a possibilidade de se estudar variáveis em níveis diferentes.[42]

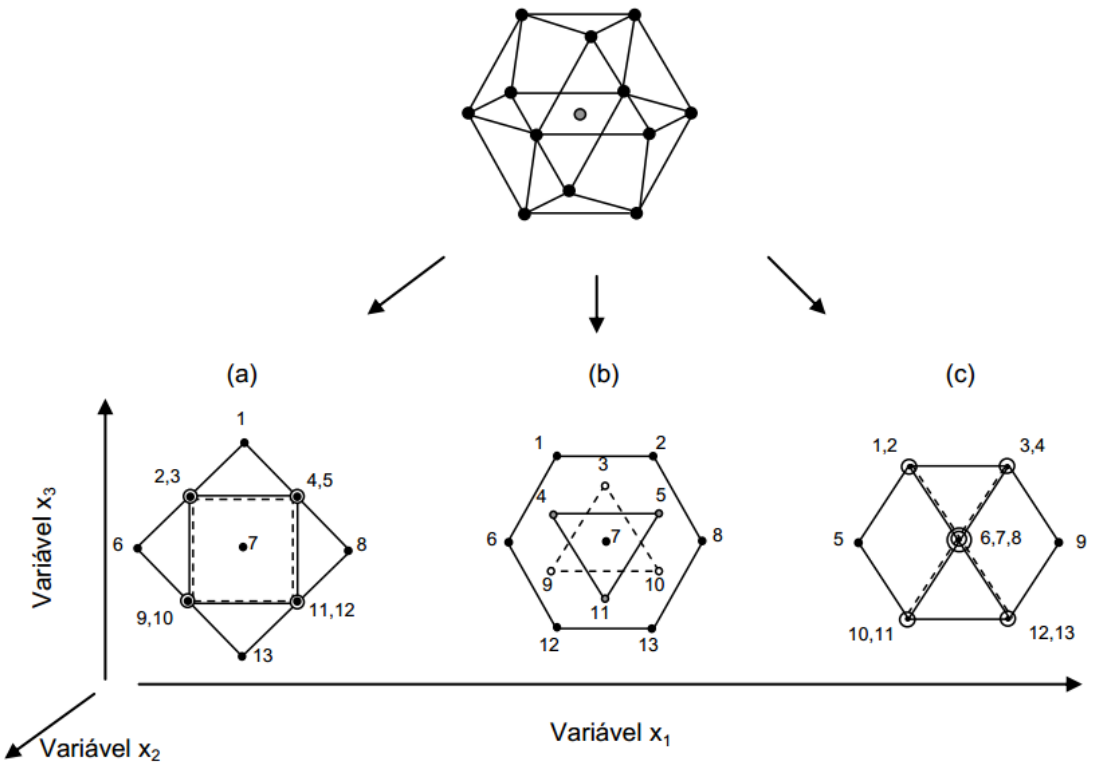


Figura 5. Planejamentos Doehlert para três variáveis originados por deferentes projeções planas do cubo octaedro

Até agora foi apresentado o planejamento Doehlert para duas e três variáveis, no entanto, esse planejamento experimental também pode ser utilizado para mais de três variáveis. As matrizes experimentais com valores codificados para otimização de quatro e cinco variáveis estão expostos, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.[41]

Tabela 1. Matriz Doehlert para quatro variáveis.

	Variáveis Experimentais			
	A	***B***	***C***	***D***
1	0	0	0	0
2	1	0	0	0
3	0.5	0.866	0	0
4	0.5	0.289	0.817	0
5	0.5	0.289	0.204	0.791
6	-1	0	0	0
7	-0.5	-0.866	0	0
8	-0.5	-0.289	-0.817	0
9	-0.5	-0.289	-0.204	-0.791
10	0.5	-0.866	0	0
11	0.5	-0.289	-0.817	0
12	0.5	-0.289	-0.204	-0.791
13	-0.5	0.866	0	0
14	0	0.577	-0.817	0
15	0	0.577	-0.204	-0.791
16	-0.5	0.289	0.817	0
17	0	-0.577	0.817	0
18	0	0	0.613	-0.791
19	-0.5	0.289	0.204	0.791
20	0	-0.577	0.204	0.791
21	0	0	-0.613	0.791

Tabela 2. Matriz Doehlert para cinco variáveis.

	Variáveis Experimentais				
	A	***B***	***C***	***D***	***E***
1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
3	0.5	0.866	0	0	0
4	0.5	0.289	0.817	0	0
5	0.5	0.289	0.204	0.791	0
6	0.5	0.289	0.204	0.158	0.775
7	-1	0	0	0	0
8	-0.5	-0.866	0	0	0
9	-0.5	-0.289	-0.817	0	0
10	-0.5	-0.289	-0.204	-0.791	0
11	-0.5	-0.866	-0.204	-0.158	-0.775
12	0.5	-0.289	0	0	0
13	0.5	-0.289	-0,817	0	0
14	0.5	-0.289	-0.204	-0.791	0
15	0.5	-0.289	-0.204	-0.158	-0.775
16	-0.5	0.866	0	0	0
17	0	0.577	-0.817	0	0
18	0	0.577	-0.204	-0.791	0
19	0	0.577	-0.204	-0.158	-0.775
20	-0.5	0.289	0.817	0	0
21	0	-0.577	0.817	0	0
22	0	0	0.613	-0.791	0
23	0	0	0.613	-0.158	-0.775
24	-0,5	0.289	0.204	0.791	0
25	0	-0.577	0.204	0.791	0
26	0	0	-0.613	0.791	0
27	0	0	0	0.633	-0.775
28	-0.5	0.289	0.204	0.158	0.775
29	0	-0.577	0.204	0.158	0.775
30	0	0	-0.613	0.158	0.775
31	0	0	0	-0.633	0.775

No planejamento Doehlert com duas variáveis são utilizados 07 (sete) ensaios, para três variáveis utiliza 13 (treze), para quatro e cinco variáveis são utilizados 21 (vinte e um) e 31 (trinta e um) experimentos respectivamente. Vale lembrar que a quantidade de experimentos pode aumentar conforme se acrescenta as réplicas do ponto central que se deseja realizar.

2.4 PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo de amostras é uma das etapas determinante na quantificação de substâncias, pois pode envolver os processos de digestão, extração e preparação de analitos. Alguns autores relatam esta é a fase responsável por 61% do tempo de trabalho em laboratório e de 30% do erro da análise.[6]

As técnicas espectrométricas requerem dissolução total ou parcial da amostra antes da análise, por esse motivo, normalmente utiliza-se a digestão de amostras que é um processo no qual a matriz orgânica é destruída e os analitos ficam livres em solução para só assim poderem ser quantificados.[6,7]

Existem inúmeros métodos de digestão de amostra, todavia, uma das mais utilizadas é a decomposição por via úmida, em sistemas abertos ou fechados, onde se adiciona reagentes à amostra e se aplica energia suficiente para romper ligações ou dissolver a estrutura cristalina dos sólidos.[6]

A escolha do método de digestão deve levar em consideração os analitos estudados, pois em caso de voláteis não são indicados sistemas abertos, o menor tempo para decompor completamente a amostra, menor índice de contaminação, a quantidade de amostra a ser digerida e geração mínima de resíduos.

2.4.1 Decomposição por via úmida

A digestão por via úmida é um método de digestão que utiliza agentes oxidantes ou complexantes para decompor a amostra orgânica ou liberar metais das matrizes inorgânicas. Os principais reagentes utilizados são ácidos concentrados como: ácido nítrico, clorídrico, sulfúrico, fosfórico, fluorídrico ou mistura de ácidos, por exemplo, a mistura de ácido nítrico e clorídrico concentrados geralmente na proporção de um para três, chamado de água régia. Outras vezes mistura-se peróxido de hidrogênio aos ácidos.[7]

A digestão por via úmida requer além de ácidos fortes o fornecimento de energia, a fim de acelerar o processo, as principais fontes de energia são: térmica, ultra-sônica, radiante (infravermelho e ultravioleta) e microondas. A digestão em bloco digestor e com bombas de PTFE são os métodos mais utilizados em laboratórios de Química Analítica pela fácil manipulação e baixo custo.[8]

A digestão em bloco digestor consiste em uma técnica de digestão por via úmida em sistema aberto e acontece em tubos de digestão de aproximadamente 30 cm, no qual pode-se utilizar “dedo frio” para criar um refluxo dentro do tudo evitando a evaporação rápida dos oxidantes e a perda de compostos voláteis.[43,44]

Outro método de digestão por via úmida muito utilizado é a digestão com bombas de PTFE que consiste em um sistema fechado no qual utiliza um recipiente de PTFE (para o acondicionamento das amostras) revestidas por uma camisa externa (constituída de aço inoxidável e isolamento) que são aquecidos em estufa suportando altas temperaturas e pressões e impedem a perda de analitos voláteis.[6]

Uma ampla variedade de amostras pode ser eficientemente decomposta por esse método, por exemplo: ligas metálicas, amostras orgânicas, minerais comuns, solos, rochas silicatos e argila. Apesar disso, essas técnicas consomem muito tempo e utilizam uma quantidade maior de reagentes se compararmos com outros métodos de digestão.[6,45]

2.4.2 Solubilização alcalina com TMAH

Uma alternativa frente aos métodos de digestão utilizando ácidos corrosivos é a solubilização alcalina utilizando o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH). Este reagente tem demonstrado êxito na solubilização de amostras biológicas sem requerer aquecimento, evitando a perda de analitos voláteis.[12,13]

O TMAH é uma base forte de pH entre 13,4 e 14,7, de forma molecular $(CH_3)_4NOH$ e fórmula estrutural apresentado na Figura 6. Normalmente é comercializada como solução à 25% m/v em água ou metanol. Possui aparência incolor, forte odor de amina e é solúvel em água ou álcool.[9]

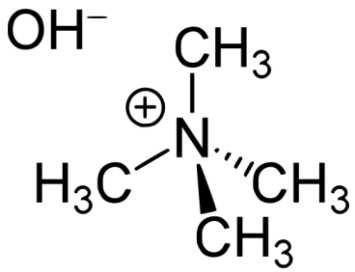


Figura 6. Fórmula estrutural do hidróxido de tetrametilamônio.

Essa base é amplamente utilizada na indústria especialmente na fabricação de semicondutores e monitores de cristais líquidos e vem ganhando destaque na química analítica nos processos envolvendo solubilização alcalina e também na preparação de amostras para a especiação elementar.[46,47]

Os primeiros relatos do uso do TMAH para solubilização de amostras foi publicado em 1973. Nele os autores propõem uma metodologia para solubilização de amostras de fígado, rim e pêlos de ratos para determinação de Cd, Cu, Pb e Zn, e compara os resultados obtidos com a digestão com ácido nítrico e/ou perclórico. Os autores relatam que a utilização de soluções de referência preparadas em HNO_3 (5% v/v) não eram adequadas, pois TMAH tem viscosidade diferente do HNO_3 o que altera a taxa de aspiração dos digeridos.[9]

Recentemente, outros trabalhos de pesquisa vêm testando a eficiência da solubilização alcalina com TMAH, e propondo outros métodos para decompor amostras diversas como: material biológico, unhas, cabelos, frangos e carne obtendo assim resultados satisfatórios após a comparação com metodologias já validadas como digestão por via úmida.[9,48]

Um desses trabalhos foi desenvolvido por BATISTA e colaboradores e nele foi possível quantificar metais (Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn) por ICP-MS e ETAAS em amostras de unha que passaram pelo processo de decomposição com TMAH a temperatura ambiente por doze horas, para comparação utilizou-se a digestão ácida assistida por microondas e segundo os autores as duas técnicas não apresentaram diferença estatística.[49]

A solubilização alcalina se destaca por ser uma técnica simples, que demanda pouca habilidade técnica do manipulador, dispensa supervisão contínua, além de dissolver rapidamente materiais biológicos especialmente quando auxiliada com microondas ou ultrassom. Amostras tratadas com TMAH podem ser armazenadas a temperatura ambiente por até três anos sem sofrer alterações nas concentrações dos metais.[50]

Com relação à toxicidade existem poucos relatos na literatura, mas já se sabe que seus odores podem causar irritação no nariz, garganta e sistema respiratório, além disso, o contato direto com a pele pode provocar queimaduras de até terceiro grau. Outros sintomas podem estar associados pelo fato do TMAH sofrer degradação e gerar o tetrametilamonio (TMA) ou tetramina, um composto de amônio quaternário tóxico.[9,46]

2.4.3 O uso de ultrassom no tratamento de amostras para análise quantitativa de metais

Na Química Analítica os processos de pré-tratamento de amostras são extremamente importantes. Diante disso, existe uma demanda por novas metodologias que sejam rápidas, de fácil execução e que utilizem quantidades menores de reagentes. Neste contexto, as metodologias auxiliadas por ultrassom vêm ganhando destaque na extração de espécies químicas em vários tipos de amostras.[10]

O ultrassom são ondas mecânicas que se propagam em meios materiais, com velocidade que pode variar de centenas de metros por segundo no ar até milhares de metros por segundo em sólidos. A frequência do ultrassom varia no intervalo de 16 KHz a 1 MHz, esta frequência fica fora da faixa de alcance do ouvido humano (16 Hz a 16 KHz), por esse motivo ela é imperceptível aos humanos.[10,11]

O banho de ultrassom, equipamento usado nesses processos analíticos de pré-tratamento de amostras, possui um recipiente metálico e em sua parte interna estão acoplados transdutores piezelétricos (normalmente cerâmicas) que são responsáveis por gerar o ultrassom de frequência de aproximadamente 42 KHz.[11,51]

As ondas ultrassônicas se propagam em meio que tenha propriedades elásticas e isso gera um efeito em cadeia, pois o movimento de um corpo vibrando é transmitido para as moléculas adjacentes, as quais, antes de retornar o equilíbrio transmitem o movimento para as moléculas que estão ao redor, criando ciclos de compressão e expansão, esta é a principal característica do fenômeno chamado cavitação.[11]

O efeito cavitacional gerado pelo ultrassom é capaz de acelerar os processos de digestão e extração pelo fato de proporcionar agitação mecânica que provoca colapsos nas cavidades formadas nos líquidos e sólidos devido às alternâncias entre as zonas de alta e baixa pressão das ondas ultrassônicas. Isso facilita a extração dos elementos, a sedimentação do material particulado em suspensão e promove a quebra de células vegetais.[52]

Várias metodologias utilizando ultrassom estão sendo desenvolvidas a fim de acelerar as extrações de metais, dentre esses métodos destacam-se as digestões ácidas e as alcalinas, que tem apresentado resultados apreciáveis em uma infinidade de amostras: alimentos, solo, águas, folhas de vegetais, cabelos, leite e algas comestíveis.[9,10,53]

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico de pré-tratamento de amostras utilizando solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) com o auxílio de energia de ultrassom visando a determinação dos metais Ca, Fe, Mg e Zn em amostras de filés de peixes e detecção por espectrometria da absorção atômica com chama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Utilizar o planejamento multivariado Doehlert para otimizar as variáveis envolvidas no processo de solubilização alcalina.

- ✓ Validar a metodologia de pré-tratamento utilizando solubilização alcalina visando determinação de metais em amostras de peixes.

- ✓ Aplicar a metodologia estudada em amostras de peixes adquiridas no comércio de Jequié-BA.

- ✓ Determinar os teores de cálcio, ferro, magnésio e zinco nas amostras de peixes por espectrometria de absorção atômica com chama.

- ✓ Avaliar se as concentrações dos metais estão de acordo com as recomendações da Portaria n° 685, de 27 de agosto de 1998 da ANVISA e comparar os valores encontrados com os apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A quantificação dos metais foi realizada utilizando um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS), marca Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA), modelo AAnalyst 200 equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo. Lâmpadas de cátodo oco (HCL) da marca Perkin Elmer foram utilizadas. Outros parâmetros utilizados nas analises estão descrito na Tabela 3.

As medições de turbidimetria foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc (Palo Alto, Califórnia, Estados Unidos da América) e as soluções foram colocadas numa cubeta de vidro de 1,0 cm.

O processo de liofilização das amostras de peixes fresco foi realizado em um liofilizador da marca Terroni (São Carlos, SP, Brasil), modelo LS 3000. A digestão ácida das amostras ocorreu em bloco digestor da marca Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil), modelo 040125 com tubos digestores de vidro e “dedo frio”. Banho ultrassônico, marca Cristofoli (Campo Mourão, PR, Brasil) foi utilizado para dissolução alcalina.

Tabela 3. Parâmetros do Espectrômetro de absorção atômica com chama.

Parâmetros	**Ca**	**Fe**	**Mg**	**Zn**
Comprimento de onda (nm)	422,7	248,3	285,2	213,9
Altura do queimador	13,5	13,5	13,5	13,5
Largura da fenda	13,5	0,7	13,5	0,7
Vazão do fluxo de acetileno (L min^{-1})	2,50	2,50	2,50	2,50
Vazão do fluxo de ar (L min^{-1})	10,0	10,0	10,0	10,0
Vazão do fluxo de nebulização (mL min^{-1})	7,4	7,4	7,4	7,4

4.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Processador Philips Walita
- Tubos falcon de polietileno de capacidade 25 mL
- Balança analítica
- Termômetros
- Sistema de purificação de água QUIMIS (São Paulo, SP, Brasil)

- Vidraria convencional (balões volumétricos, béqueres, bastões de vidro, tubos de ensaio) que foi descontaminada em solução de HNO_3 5% (v/v) por 24 h, enxaguada com água deionizada e seca em ambiente livre de poeira.
- Papel filtro Quanty JP 40, poros de 25 µm

4.3 REAGENTES

- Hidróxido de tetrametilamônio 25% (m/v) (Sigma)
- Ácido nítrico 65% (F. MAIA)
- Peróxido de hidrogênio 30% (m/v) (Merck)
- Solução padrão de cálcio, ferro, magnésio e zinco (Fluka)

4.4 SOLUÇÕES

As soluções intermediárias multielementares foram preparadas medindo em micropipetas calibradas quantidades apropriadas de solução multielementar 1000 mg L^{-1} contendo os elementos de estudo e diluindo para 20 mL com água deionizada.

Para preparo das curvas analíticas em meio ácido utilizou-se 5 % de HNO_3 e em meio básico acrescentou-se 620 µL de TMAH e as respectivas quantidades da solução intermediária.

4.5 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de filé peixes congelados foram coletadas no comércio de Jequié em agosto de 2015 e, em seguida, trituradas em processador. Parte das amostras foi colocada em tubos falcon e mantidas em freezer a -21 ºC para posterior liofilização. O restante foi guardado em recipientes plásticos devidamente rotulados e conservados em refrigerador para testes posteriores. Foram também adquiridas três amostras de material de referência certificado Tort-3 (hepatopancreas de lagosta), Dolt-4 (fígado de peixe) e ERM-CE 278 (tecido de mexilhão).

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

Um mix de peixes foi preparado misturando quantidades iguais das amostras de filé de peixes. Posteriormente foram acondicionadas em tubos falcon e mantidas sob refrigeração.

As amostras, exceto as certificadas, e o mix de peixes foram liofolizadas sob vácuo de aproximadamente 0,119 µmHg e temperatura – 46 ºC durante 24 horas. Em seguida foram cominuídas em processador e peneiradas para homogeneização e guardadas em refrigerador.

Cerca de 0,250 g das amostras foram pesadas em papel manteiga e transferidas para tubos de ensaios nos quais adicionou-se 620 µL de TMAH 25% e 1380 µL de água destilada. A seguir foram levados um a um ao banho de ultrassom à 46 ºC por 25 minutos. Logo após, o digerido foi transferido para tubos falcon e avolumados para 20 mL com água destilada.

4.7 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA

Massas de aproximadamente 0,250 g do mix de peixes foram levadas ao sistema de solubilização alcalina com TMAH utilizando banho de ultrassom, apresentado na Figura 7, nas condições propostas pela matriz experimental do planejamento Doehlert (Tabela 4). No final foram avolumadas como água deionizada para 20 mL.

A matriz do planejamento Dohelert envolveu 13 experimentos, realizados em triplicata, e possibilitou o estudo de três variáveis: volume de TMAH, tempo de sonicação e temperatura de solubilização. A matriz Dohelert viabilizou a análise das variáveis volume de TMAH (400 e 1000 µL) e tempo de sonicação (5 a 45 min) em cinco níveis, enquanto a temperatura do banho de ultrassom variou em três níveis entre 30 e 50 ºC.

Figura 7. Sistema de solubilização alcalina com banho de ultrassom

4.8 DIGESTÃO ÁCIDA

Massas de aproximadamente 0,250 g do mix de peixes foram transferidas para os tubos de digestão, no qual foram adicionados 1,5 mL de HNO_3 concentrado e levados ao bloco digestor (Figura 8) por uma hora, após esse tempo, adicionou-se 2,0 mL de H_2O_2 e manteve no bloco por mais uma hora, ou até se perceber que a amostra foi eficientemente decomposta. Este processo foi realizado em triplicata. A temperatura do sistema variou entre 105 e 110 ºC.

Figura 8. Digestão ácida em bloco digestor utilizando "dedo frio".

4.9 MEDIDAS DE TURBIDEZ DAS AMOSTRAS

Após realizar a solubilização alcalina do mix de peixes, nas condições propostas pela matriz experimental do planejamento Dohelert, uma réplica de cada ensaio foi levado ao espectrômetro de absorção UV-Vis para realizar medidas de turbidez, no comprimento de onda de 650 nm.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados obtidos nas atividades experimentais foi realizada utilizando o programa Statística Versão 10.0 através da modelagem de superfícies de respostas e o programa Office Excel para obtenção de parâmetros básicos como: média, desvio padrão, desejabilidade, intervalo de confiança, construção de curvas analíticas, entre outros.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA COM TMAH ASSISTIDA POR ENERGIA DE ULTRASSOM

Para o desenvolvimento desse método de solubilização as amostras foram colocadas individualmente na região central do banho de ultrassom a fim de que pudessem aproveitar o melhor desempenho do aparelho e para que não houvessem grandes variações entre as amostras, já que a frequência pode variar dependendo da região em que é colocado na cuba.

Além do banho de ultrassom utilizou-se também um termômetro para controlar a temperatura, visto que esta foi uma das variáveis estudadas e o equipamento não faz esse controle. Além da temperatura pode-se otimizar o tempo de sonicação e o volume do reagente TMAH que talvez seja o fator mais importante pois este é o responsável direto pela dissolução da matriz.

Para estudar o volume de TMAH, ele foi variado em cinco níveis, 200, 400, 600, 800 e 1000 µL, após foi adicionada água deionizada até 2000 µL para que toda a amostra tivesse contato com o reagente, pois, nos testes iniciais percebeu-se que os volumes inferiores a 600 µL de TMAH não eram suficientes para umedecer a quantidade de amostra utilizada e ao final do tempo parte da amostra permanecia inalterada. Logo após a adição do reagente as amostras foram colocadas em banho de ultrassom e se iniciou contagem do tempo.

Para otimização das variáveis um planejamento multivariado Doehlert foi aplicado e após a execução dos experimentos os dados de absorbância obtidos no FAAS foram utilizados para calcular o percentual de recuperação, utilizando-se a Equação 01 [54], onde o valor da média está relacionada com o valor da concentração obtido na triplicara do experimento usando solubilização alcalina e o valor real é a média obtida na digestão ácida. Os resultados encontrados estão expostos na Tabela 4.

$$\%\, recuperação = \frac{média}{valor\ real} \times 100 \qquad \text{(Equação 01)}$$

Tabela 4. Planejamento Doehlert aplicado na otimização das variáveis envolvidas na solubilização alcalina com TMAH de filé de peixes para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn.

Exp	Variáveis independentes			Recuperação (%)				DG	Turbidez (-log T)
	TMAH (μL)	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Ca	Mg	Fe	Zn		
1	600	45	40	92.59	69.37	62.69	22.89	0,00750767	0.197
2	400	35	30	46.73	54.13	60.39	8.90	0,00143900	0.144
3	400	35	50	47.91	54.42	65.34	5.39	0,00204733	1.114
4	800	35	30	51.95	55.09	55.09	9.77	0,00106733	0.342
5	800	35	50	100.3	80.89	72.92	35.64	0,02404667	0.271
6	200	25	40	24.57	72.86	45.06	44.30	0,00080800	0.947
7	600	25	40	80.19	102.59	68.31	15.07	0,01624233	0.245
8	1000	25	40	79.48	60.43	62.11	15.29	0,00580533	0.249
9	400	15	30	33.80	56.26	54.29	10.58	0,00052667	0.159
10	400	15	50	32.49	44.87	51.29	105.5	0,00157033	1.054
11	800	15	30	32.59	60.21	36.03	81.49	0,00266933	0.179
12	800	15	50	66.58	69.20	68.04	12.61	0,00300467	0.200
13	600	5	40	17.76	79.09	27.21	35.27	0,00001867	0.894

DG: Desejabilidade Global

Para a análise dos dados preferiu-se utilizar o método proposto por Derringer e Suich, que otimiza respostas múltiplas através da função de desejabilidade. A desejabiliade individual (d) é gerada através da padronização da resposta com valores restritos ao intervalo [0,1], sendo zero o valor inaceitável e um o valor mais desejável, calculadas através da Equação 02[38], onde y é a resposta analisada, L é a menor resposta obtida, T é o valor alvo[31].

$$d = \begin{cases} 0, \ se\ y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right), se\ L \leq y \ \leq T \\ 1, \ se\ y > T \end{cases} \qquad \text{(Equação 02)}$$

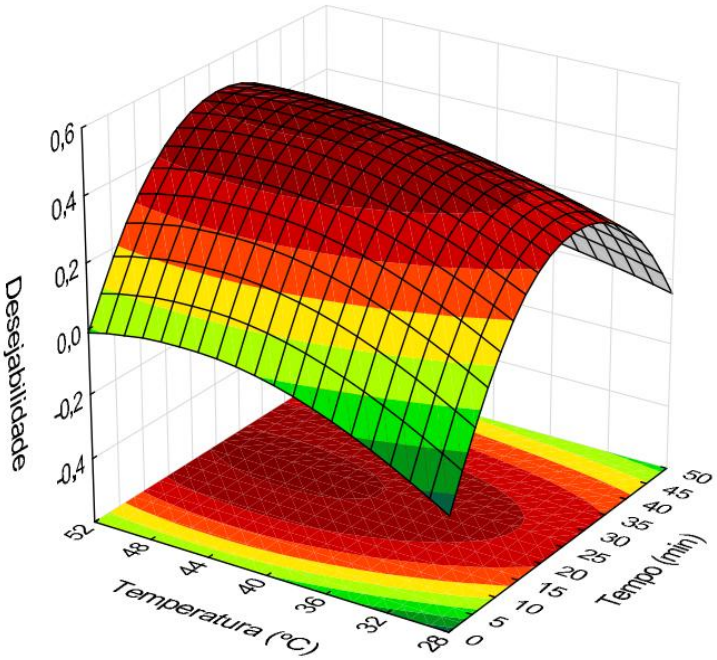
Após os cálculos das desejabilidades individuais se faz necessário combinar estas respostas em desejabilidade global (D), que é obtida pela média geométrica das desejabilidades individuais, conforme a Equação 03.[38]

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \ldots d_m} \qquad \text{(Equação 03)}$$

Os resultados foram tratados no programa Statística gerando as superfícies de respostas e as curvas de níveis, expostas nas Figuras 9 a 11, que demonstram o comportamento das respostas em função da alteração dos níveis das variáveis e

possibilita a localização das regiões ótimas de acordo com as condições propostas pelo planejamento Doehlert aplicado.

(a)



(b)

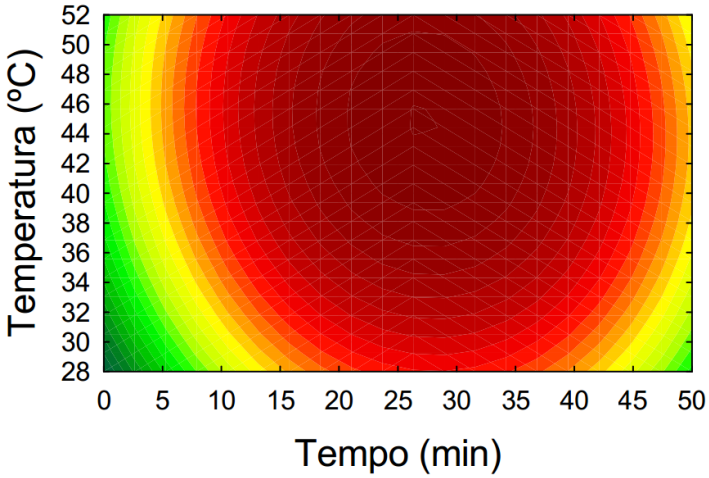
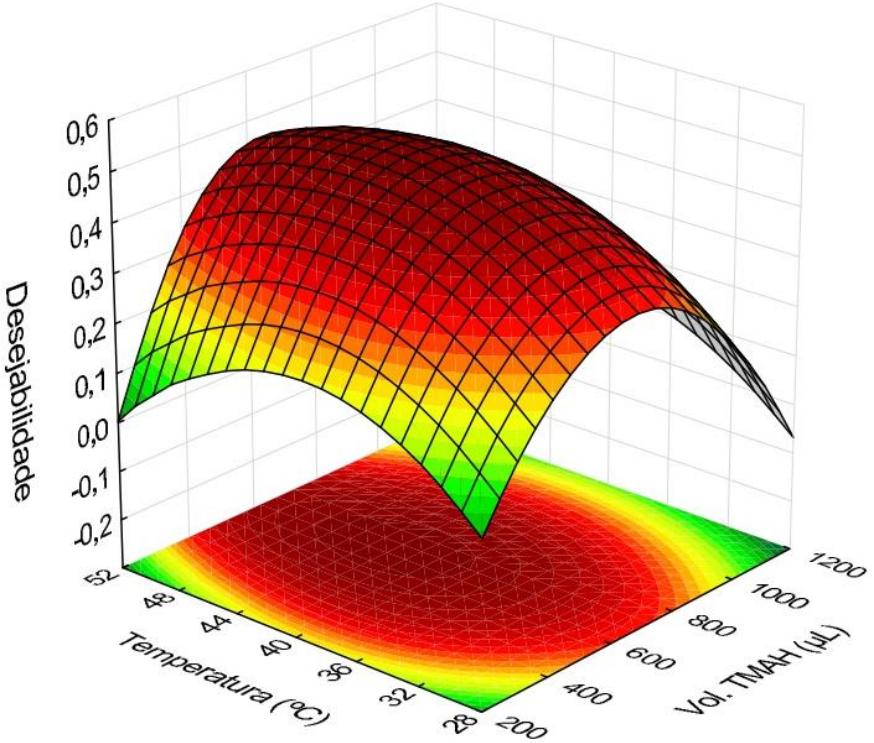


Figura 9. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis tempo de sonicação e temperatura do banho de ultrassom.

A Figura 9 (a) e (b) apresenta a superfície de resposta e a curva de nível relativa à temperatura e tempo de sonicação, a resposta desejada está apresentada na região de máximo, em vermelho mais intenso, onde também se apresenta o intervalo de robustez com o tempo variando entre 20 e 35 minutos e com temperatura entre 40 e 50 ºC.

(a)



(b)

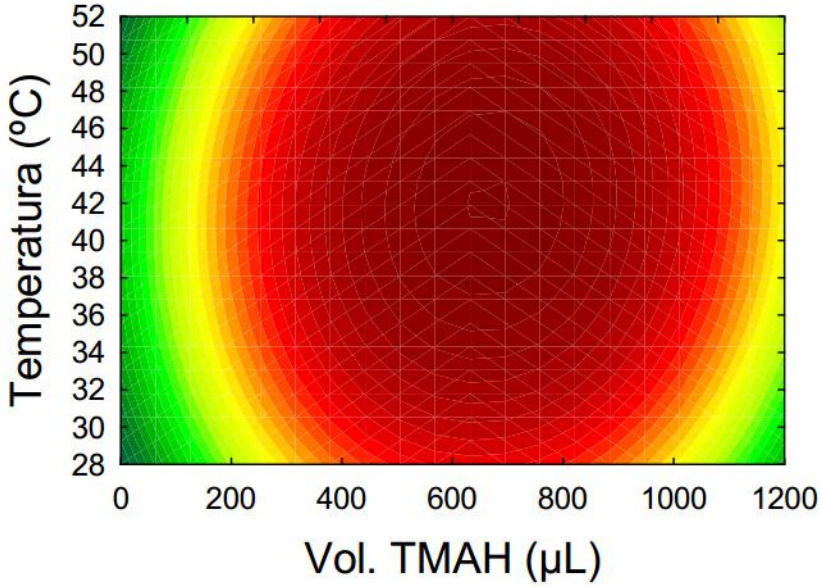
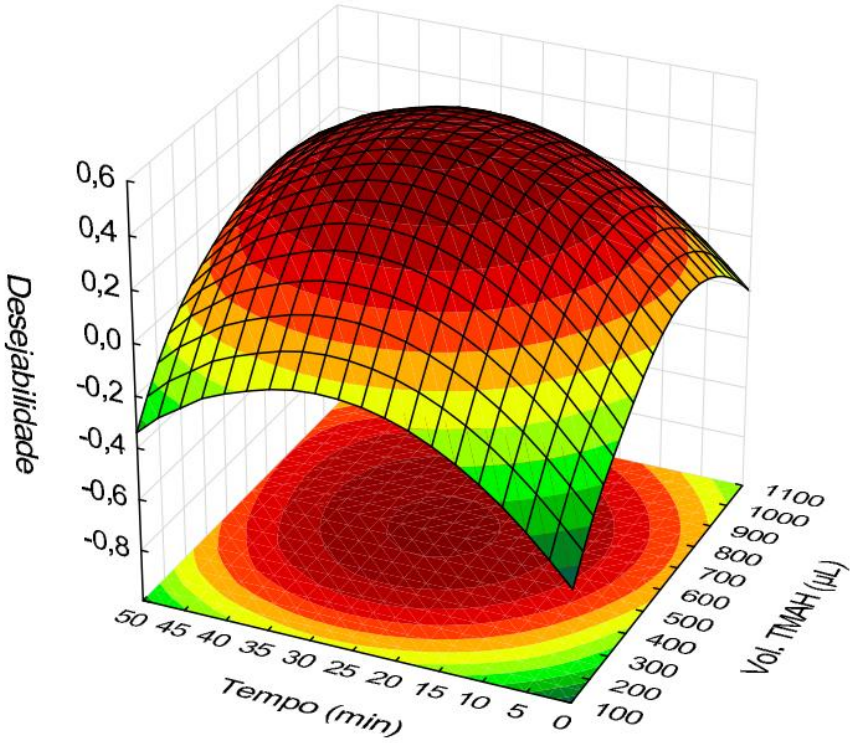


Figura 10. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis temperatura do banho de ultrassom e volume de TMAH.

Analisando a Figura 10 (a) e (b), que confrontam os fatores temperatura do banho de ultrassom e volume de TMAH, nota-se que o intervalo de robustez se encontra quando volume de TMAH está entre 600 e 700 µL e temperatura do banho de ultrassom entre 38 e 48 ºC.

(a)



(b)

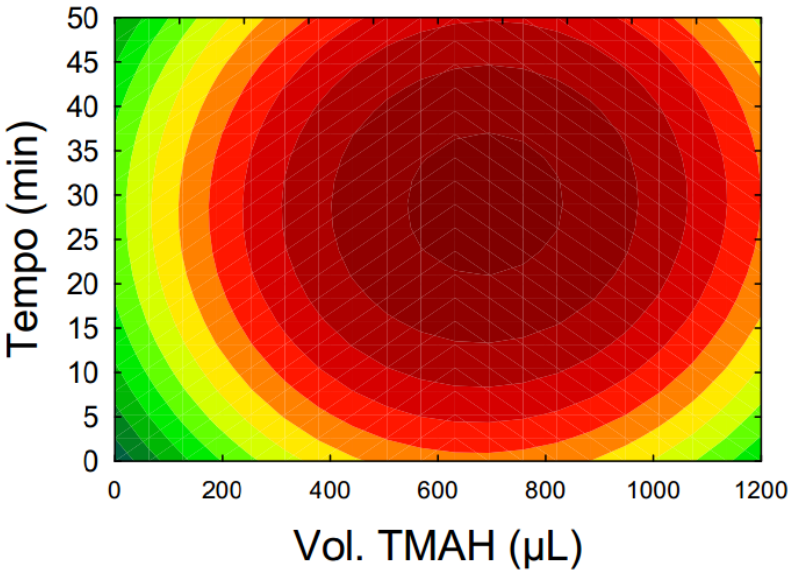


Figura 11. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis tempo de sonicação e volume de TMAH.

A Figura 11 (a) e (b) apresenta a superfície de resposta e a curva de nível que relaciona o volume de TMAH e o tempo de solubilização, e observamos que o intervalo de robustez se apresenta quando o volume de TMAH está entre 600 e 800 µL e o tempo de sonicação está entre 25 e 35 minutos.

A Figura 12 mostra os resultados do algoritmo de otimização no qual apresenta os gráficos que relacionam as variáveis volume de TMAH, tempo de sonicação e temperatura, representadas nas três primeiras colunas, com as respostas obtidas experimentalmente (recuperação dos metais) apresentadas nas linhas horizontais na ordem Fe, Zn, Ca e Mg, respectivamente.

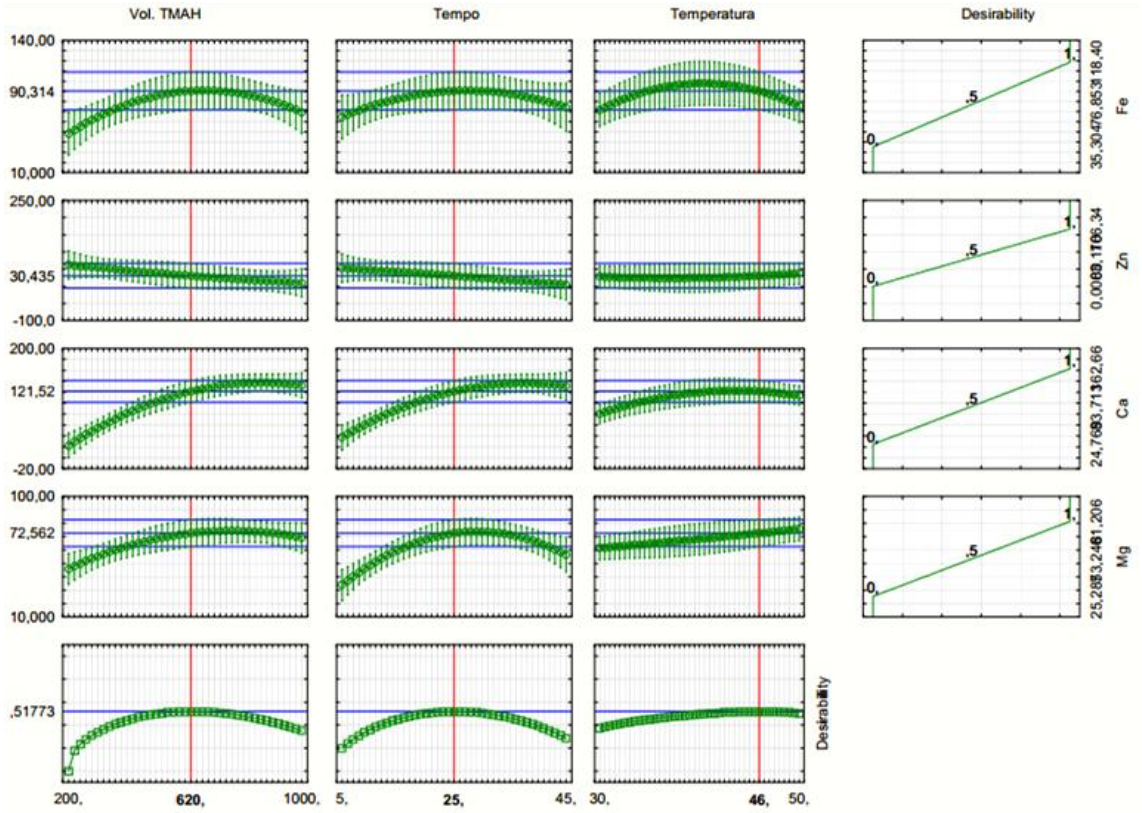


Figura 12. Perfis das desejabilidades individuais para Fe, Zn, Ca, Mg e perfil de desejabilidade global.

As linhas em vermelho sinalizam as condições de máxima desejabilidade global, ou seja, estes são os valores ótimos das variáveis para que se possam obter as melhores respostas de todos os analitos ao mesmo tempo. Os valores otimizados foram: 620 µL para o volume de TMAH, 25 minutos de sonicação e temperatura de 46 ºC.

Partindo do princípio que na desejabilidade ocorre a combinação das melhores condições para todas as variáveis, isso não significa que aplicando os valores otimizados teremos as máximas recuperações dos analitos, pelo contrário, algumas vezes como visto a variável temperatura é possível notar que para o Fe a condição ideal se apresenta numa temperatura menor, todavia para os outros seria

próximos aos 46 ºC definidos pelo programa. Este é um problema recorrente quando se trabalha com resposta múltipla.

Nas condições otimizadas a desejabilidade global foi igual a 0,51773, que não é um valor tão bom pois a literatura recomenda que quanto mais próximo a um for a desejabilidade, mais adequadas serão as condições para todos os analitos, no entanto, nota-se que o rendimento da reação foi adequado para Fe, Ca e Mg, como apresentado pelas linhas horizontais em azul, onde os valores estimados nas condições otimizadas foram 90, 121 e 72%, respectivamente. Apenas o Zn apresentou rendimento baixo, cerca de 30%.

Apesar de alguns resultados não se apresentarem satisfatórios seria adequado a utilização desta metodologia para a determinação dos metais em estudo tendo em vista que é inviável utilizar um conjunto de condições distintas para quantificar metais diferentes numa mesma amostra.

5.2 MEDIDAS DE TURBIDEZ

A turbidimetria é uma técnica fotométrica que se baseia na quantificação da radiação dispersada por partículas em suspensão.[55] Neste sentido, podemos relacionar o valor de – log T à eficiência da solubilização, ou seja, quanto mais turva a solução maior o espalhamento da radiação.

A escolha do comprimento de onda a ser utilizado no fotômetro UV-Vis no teste de turbidimetria depende da coloração da amostra, como a solução de trabalho é incolor e possui partículas também incolores pode-se utilizar qualquer comprimento de onda no espectro visível. No entanto, escolheu-se 650 nm pelos valores obtidos se ajustar em uma faixa cômoda de trabalho.[56] Os resultados do teste de turbidimetria estão expostos na Tabela 4.

Uma análise prévia da digestão de amostras pode ser feita através da turbidez do digerido, a falta de partículas na solução demonstra que a solubilização foi eficiente. A Figura 13 mostra uma réplica de cada ensaio realizado na otimização do planejamento experimental Doehlert, nela podemos notar que os digeridos 01, 03, 05, 07, 08 e 12 estão límpidos, enquanto o restante está bastante turvo e isso implica que algumas condições do planejamento não são eficientes para solubilizar as amostras de peixes.

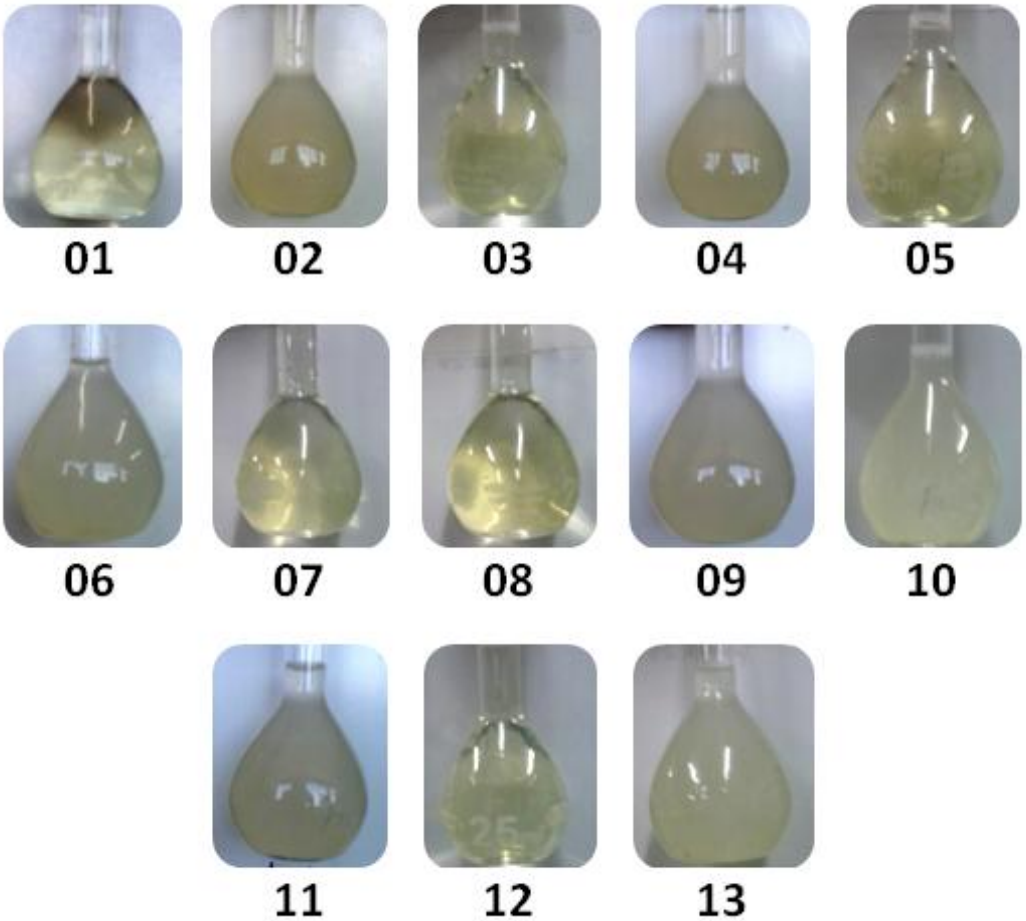


Figura 13. Mix de peixes digeridos nas condições propostas pela matriz Doehlert.

Os resultados de turbidimetria expressos na forma de – log T foram lançados no programa Statística a fim de ajustar uma função e gerar superfícies de resposta e curvas de níveis, as quais estão dispostas nas Figuras 14 e 15. Vale lembrar que as melhores respostas se apresentam nos pontos de mínimo, pois, está relacionada à limpidez do digerido, portanto, quanto menor a turbidez mais bem digerida está a amostra.

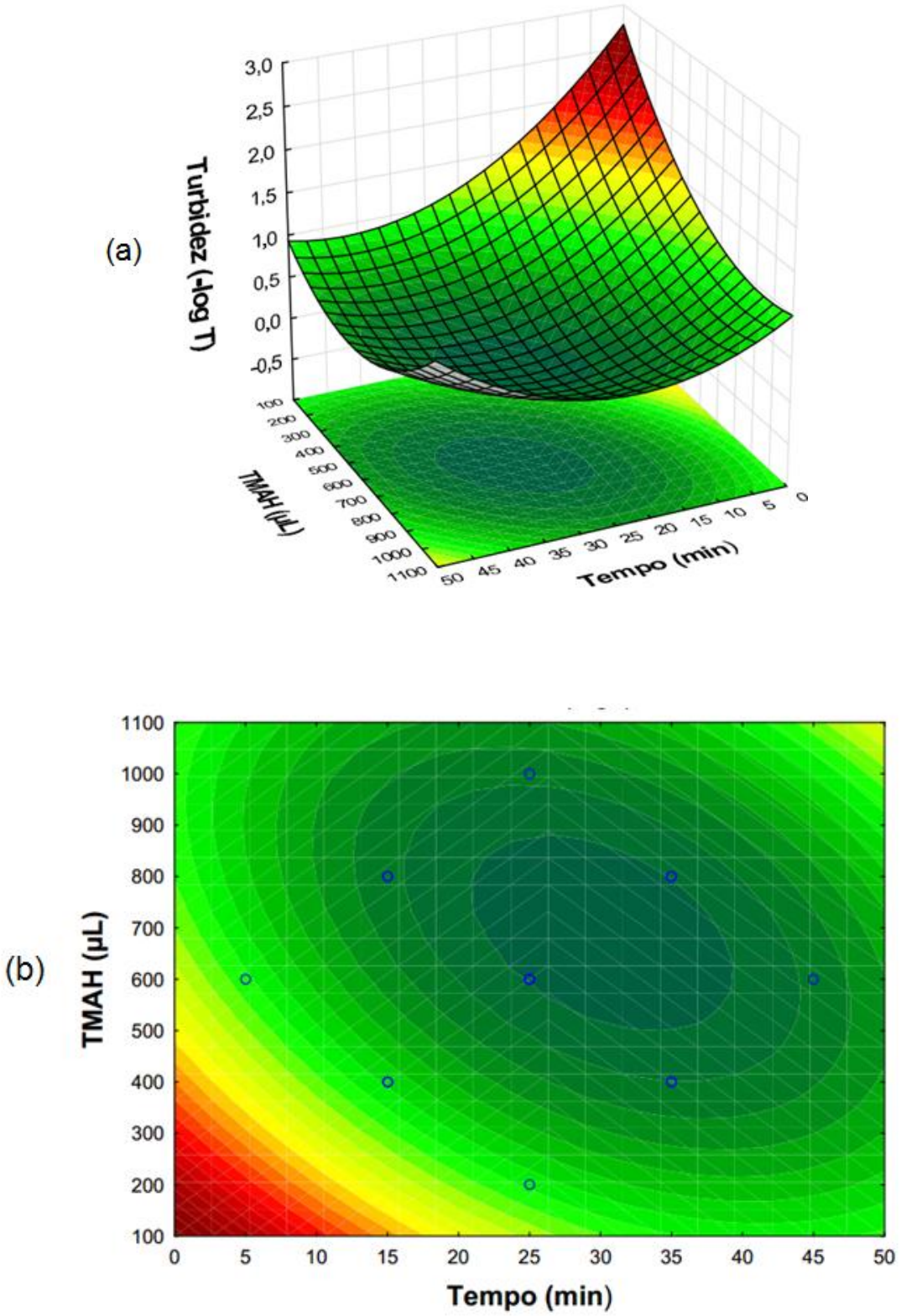
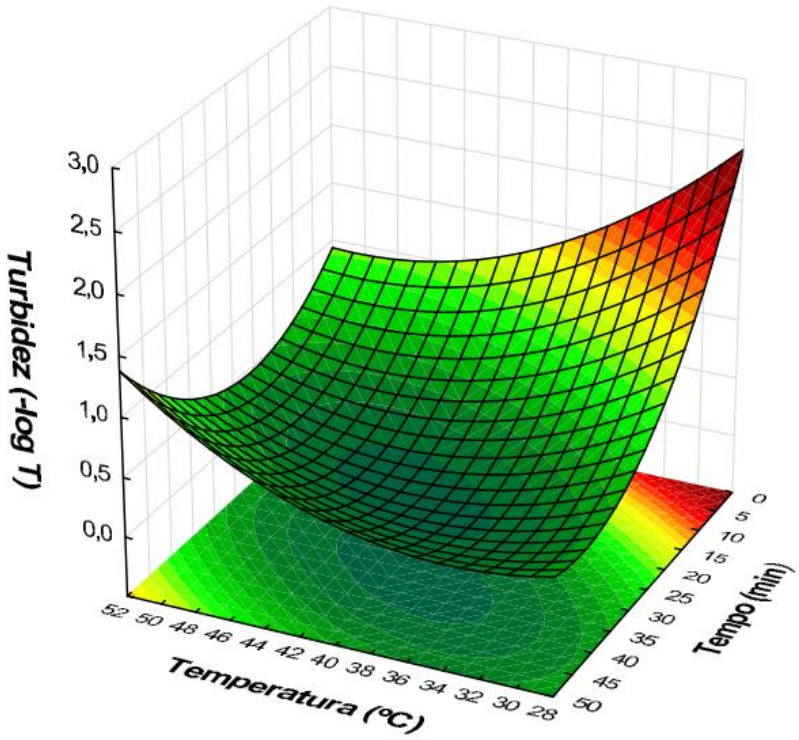


Figura 14. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis relacionado as variáveis volume de TMAH e tempo de sonicação do teste de turbidimetria.

(a)



(b)

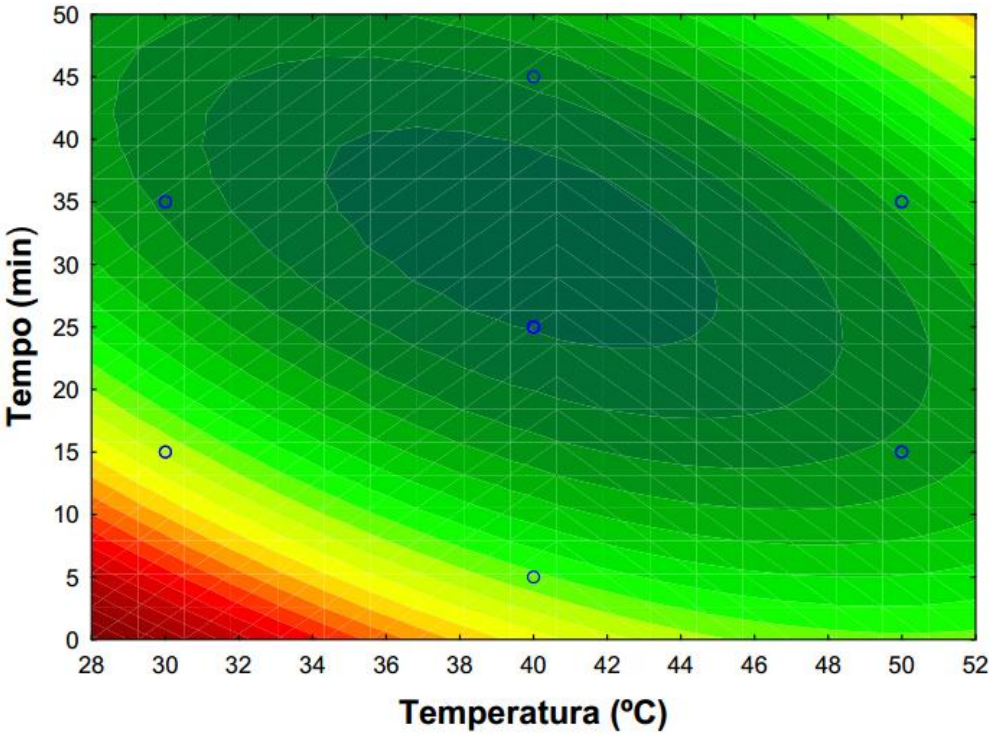


Figura 15. (a) Superfície de resposta (b) curvas de níveis das variáveis tempo de sonicação e temperatura do teste de turbidimetria.

Os pontos ótimos obtidos segundo o programa são: 700 µL para o volume de TMAH, 40 ºC para a temperatura do banho de ultrassom e 30 minutos é o tempo de sonicação. Nota-se que estas condições se encontram dentro também da região ótima das superfícies de respostas usando a desejabilidade global como resposta (Figuras 9 a 11). Os intervalos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação entre os intervalos ótimos das variáveis avaliados através das respostas recuperação e turbidez.

	Vol TMAH (µL)	Tempo (min)	Temperatura (ºC)
Recuperação	600 - 700	20 - 35	40 - 50
Turbidimetria	600 - 900	25 - 40	34 - 44

Ao analisar os intervalos de robustez nota-se uma grande interseção entre seus valores o que demonstra que a modificação das condições ótimas dentro destes intervalos não causaria alterações significativas na eficiência da digestão, além disso, nota-se que as duas respostas se apresentaram adequadas para avaliar o método de solubilização.

5.3 AVALIAÇÃO DO MODELO PROPOSTO

A análise de variância (ANOVA) é um método utilizado para avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo. Com ela é possível avaliar vários parâmetros através da análise das Somas Quadráticas (SQ) e das Médias Quadrática (MQ) (da regressão, do resíduo, da falta de ajuste e do erro puro) que são calculadas dividindo o valor de cada SQ pelo número de grau de liberdade associado.[31,57]

Com os valores das Médias Quadráticas é possível verificar a qualidade do modelo através de uma comparação entre as variâncias calculadas (MQ) por meio do teste F. Os dois valores de F foram calculados através da razão entre a Média Quadrática da regressão (MQ_R) e a Média Quadrática do resíduo (MQ_r) e entre a Média Quadrática da falta de ajuste (MQ_{fa}) pela Média Quadrática do erro puro (MQ_{ep}), respectivamente. Todos os valores da análise de variância estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise de variância para o modelo quadrático ajustado à resposta desejabilidade global em nível de confiança de 95%.

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F calc	F tab
Regressão	0,0016	9	0,000177667	3,77	2,22
Resíduo	0,00136	29	4,70345E-05		
Falta de ajuste	0,0003	3	0,000083	1,94	2,98
Erro puro	0,0011	26	0,000043		
Total	0,003	38			

SQ: soma quadrática; Gl: grau de liberdade; MQ: média quadrática.

Através do teste F podemos inferir que a equação da regressão é estatisticamente significativa uma vez que o F calculado (3,77) > F tabelado (2,22), num nível de confiança de 95%. A falta de ajuste também pode ser avaliada, sendo o F calculado (1,94) < F tabelado (2,98) temos evidências estatísticas para admitir que o modelo quadrático não apresenta falta de ajuste.

5.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

O processo de validação de uma metodologia é muito importante, pois através dele aferimos se a técnica está realmente adequada para o uso pretendido. Vários parâmetros podem ser utilizados para a validação, podendo destacar a linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

5.4.1 Linearidade

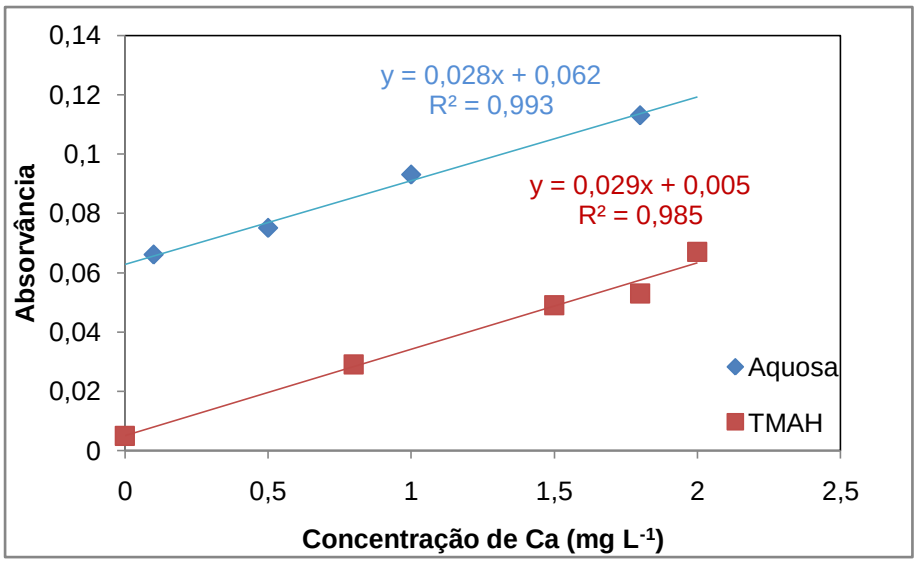
A linearidade demonstra a eficiência da metodologia em fornecer resultados diretamente proporcionais entre os resultados obtidos e a concentração do analito na amostra. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RE nº 899 de 29 de março de 2003, recomenda que sejam testadas pelo menos cinco concentrações diferentes.[58]

Os resultados serão satisfatórios primeiramente se, for possível notar relação linear aparente, e só então o coeficiente de determinação é determinado, devendo apresentar valores de R igual à 0,99. Segundo a ANVISA, no entanto, o Instituto

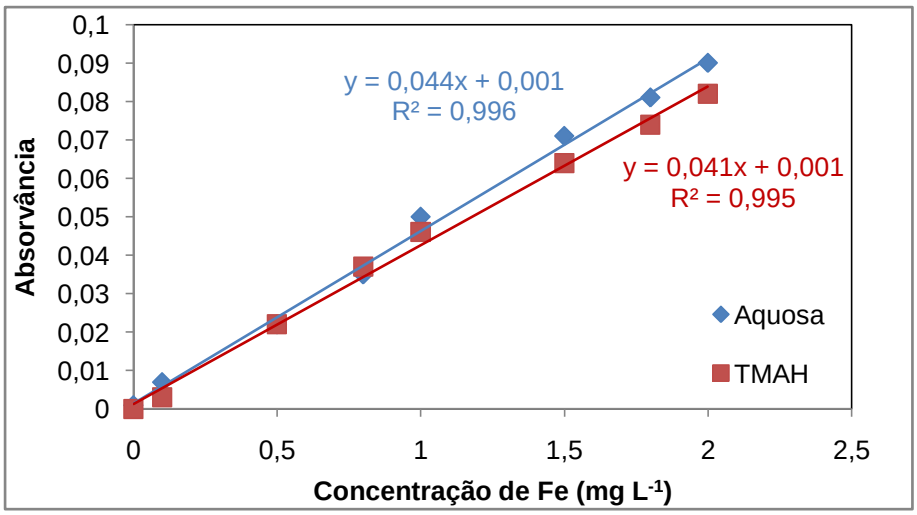
Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) aceita que R seja superior a 0,90.[59,60]

As curvas analíticas foram preparadas pela técnica de padrão externo. A Figura 16 apresenta as curvas analíticas para os metais Ca, Fe, Mg e Zn. Os dados apresentados em azul referem-se à curva aquosa e em vermelho está relacionada às curvas com adição de TMAH, empregada para avaliar o efeito da viscosidade na determinação dos metais.

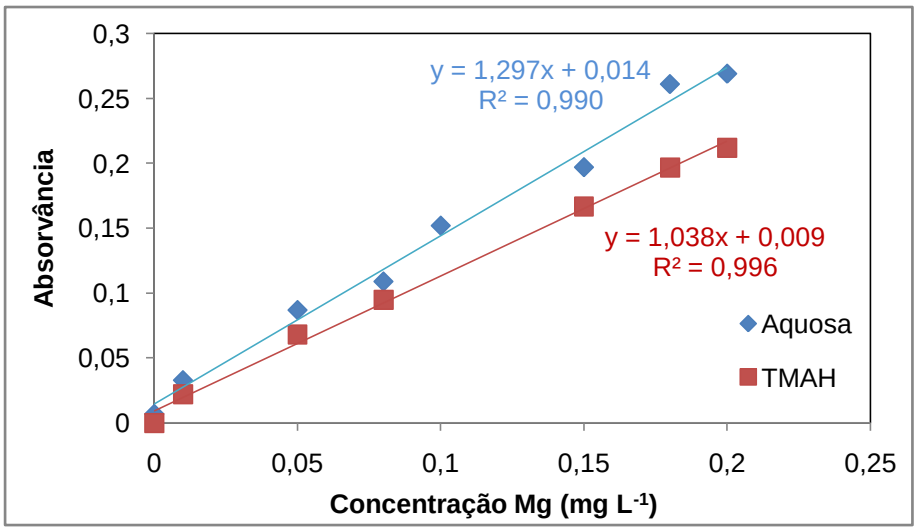
(a)



(b)



(c)



(d)

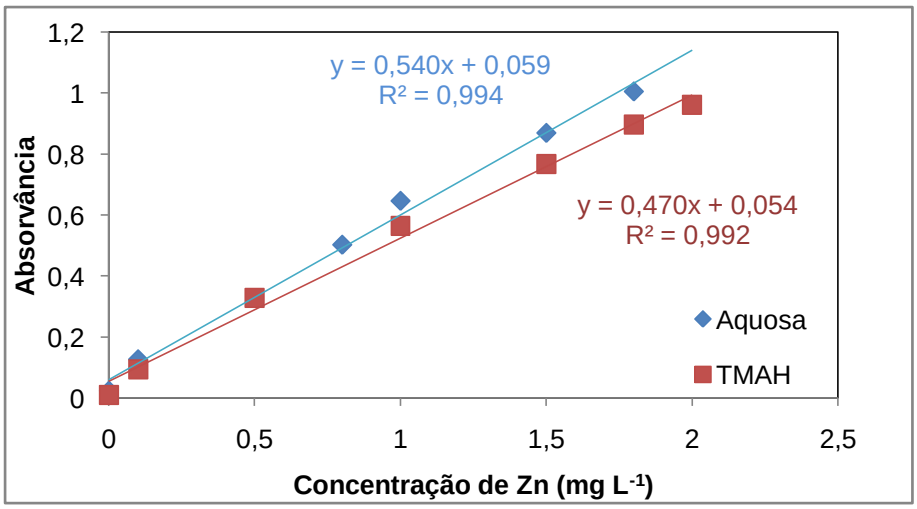


Figura 16. Curvas analíticas dos metais Ca (a), Fe (b), Mg (c) e Zn (d) obtidas nos meios aquoso e TMAH.

Avaliando os coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas notamos que todas apresentam R^2 acima de 0,99, no entanto, a curva de TMAH para o cálcio apresenta um R^2 = 0,985, que é o menor valor, isso nos diz que há 98,5% de concordância entre as duas variáveis, a literatura recomenda que R^2 seja mais próximo a 1 (um) portanto todos os valores são aceitáveis.

Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas para o Ca, Fe, Mg e Zn obtidos obtidas nos meios aquoso e TMAH.

Meio	Técnica de calibração	Equação	Intervalo do coeficiente angular*	R^2
Ca				
Aquoso	Pad. externo	y = 0,028x + 0,062	0,02148 - 0,03509	0,993
TMAH	Pad. externo	y = 0,029x + 0,005	0,02263 - 0,03574	0,985
Fe				
Aquoso	Pad. externo	y = 0,044x + 0,001	0,04201 - 0,04766	0,996
TMAH	Pad. externo	y = 0,041x + 0,001	0,03844 - 0,0442	0,995
Mg				
Aquoso	Pad. externo	y = 1,297x + 0,014	1,17135 - 1,42299	0,990
TMAH	Pad. externo	y = 1,038x + 0,009	0,96220 - 1,11424	0,996
Zn				
Aquoso	Pad. externo	y = 0,540x + 0,059	0,48385 - 0,59805	0,994
TMAH	Pad. externo	y = 0,470x + 0,054	0,42461 - 0,51586	0,992

* Intervalo de confiança de 95%

A Tabela 7 apresenta os parâmetros das curvas analíticas no nível de confiança de 95%. Podemos observar na coluna quatro o comportamento do parâmetro intervalo do coeficiente angular que nos permite avaliar se as inclinações das curvas analíticas são equivalentes e isso pode ser notado quando os intervalos possuírem interseção.

Todas as curvas em meio aquoso e em TMAH para a determinação dos metais (Ca, Fe, Mg e Zn) apresentam interseção entre si sendo assim, não demonstra diferenças significativas entre os coeficiente angulares das curvas analíticas de cada metal em meios diferentes. Logo, tanto a curva aquosa quanto a com TMAH poderia ser utilizada para realizar a determinação dos analitos nas amostras.

5.4.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância que se pode detectar com certo nível de confiança. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância que pode ser medida. Esse parâmetro indica com exatidão e precisão a menor concentração dos analitos que pode ser determinada.[61,62]

Para estabelecer estes limites foram realizadas as avaliações dos desvios padrões do branco, conforme as Equações 04 e 05 [63], onde o *s* representa o desvio padrão da absorvância do branco e *S* é o coeficiente angular das curvas analíticas de cada metal em estudo.

$$LD = \frac{3s}{S} \qquad \text{(Equação 04)}$$

$$LQ = \frac{10\ s}{S} \qquad \text{(Equação 05)}$$

Os limites de detecção e quantificação dos metais Ca, Fe, Mg e Zn foram calculados e estão dispostos na Tabela 8.

5.4.3 Precisão

A precisão está relacionada com a concordância das medidas entre si, ou seja, quanto maior a dispersão dos valores, menor é a precisão. Esta variável pode ser obtida de várias maneiras, uma delas é através da repetibilidade e/ou reprodutibilidade, no entanto, de maneira geral pode-se inferir que quanto maior a grandeza dos desvios, menor a sua precisão.[64]

Matematicamente existem pelo menos quatro formas de determinar a precisão, entretanto, o método escolhido utiliza do desvio padrão relativo (RSD) que é estimado através da Equação 06 [58], onde o *s* é o desvio padrão de várias medidas em uma mesma concentração e $\bar{x}$ é a média dessas medidas.

$$RSD\ (\%) = \left(\frac{S}{\bar{x}}\right) \times 100 \qquad \text{(Equação 06)}$$

Tabela 8. Parâmetros de validação para o método de solubilização alcalina com TMAH proposto.

Analíto	Ca	Fe	Mg	Zn
LD (μg g^{-1})	24	6,8	32	0,87
LQ (μg g^{-1})	56	23	107	2,9
RSD (%)	2,8	1,2	3,1	1,8

Nesta metodologia de solubilização alcalina estudada, a precisão foi apresentada como repetibilidade entre sinais de absorvâncias que apresentaram os desvios padrões relativos apresentados na Tabela 8.

5.4.4 Exatidão

A exatidão é um parâmetro da validação que está relacionado com a proximidade do valor medido em relação a um valor adotado como verdadeiro. Existem inúmeras formas de determinar a exatidão de um método. Neste trabalho utilizou-se a aplicação da metodologia em amostras certificadas e a comparação dos resultados com um método já validado.[64]

Os resultados da determinação dos metais Ca, Fe, Mg e Zn em amostras de peixes tratados por solubilização alcalina com TMAH e ultrassom foram comparados com a metodologia já validada de digestão por via úmida utilizando ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio.[12] Todos os resultados estão apresentados na Tabela 9, e através do teste t pareado foi possível avaliar se os dados são iguais estatisticamente num nível de confiança de 95%.

Tabela 9. Comparação entre as concentrações dos analitos utilizando solubilização alcalina e ácida.

Meio	Concentração da amostras de peixes (μg g^{-1})					
	Abandejo	Dourado do mar	Linguado	Merluza	Panga	Polaca do Alasca
Ca						
TMAH	142,30 ± 20,74	233,51 ± 24,91	241,59 ± 14,12	376,16 ± 15,18	735,20 ± 19,11	279,48 ± 24,25
Ácida	161,76 ± 15,81	165,95 ± 5,91	229,64 ± 40,81	398,69 ± 16,80	201,75 ± 16,38	212,33 ± 0,89
Fe						
TMAH	28,74 ± 1,23	137,05 ± 4,39	11,89 ± 1,87	55,58 ± 3,66	NA	NA
Ácida	29,49 ± 0,34	26,05 ± 1,31	16,33 ± 0,31	47,75 ± 3,51	NA	NA
Mg						
TMAH	123,62 ± 21,95	168,58 ± 2,08	169,68 ± 17,89	129,56 ± 3,52	88,94 ± 5,38	225,92 ± 13,45
Ácida	97,03 ± 19,30	125,54 ± 3,84	141,50 ± 6,30	98,63 ± 24,84	96,45 ± 9,74	140,73 ± 17,07
Zn						
TMAH	NA	7,76 ± 0,38	8,08 ± 0,38	5,57 ± 0,62	5,37 ± 0,04	6,07 ± 0,26
Ácida	NA	8,71 ± 0,99	8,90 ± 0,12	9,72 ± 0,50	6,51 ± 0,25	8,39 ± 0,47

NA = não avaliado

O teste t pareado para as concentrações de cálcio obtida através das duas metodologias diferentes apresentou equivalência estatística já que o t calculado (1,22) se apresentou inferior ao t tabelado (2,57), retirando-se a amostra de Panga que apresentou muita discrepância entre os valores que pode ter ocorrido por erros durante a solubilização das amostras.

A determinação de ferro exibiu um t calculado igual a -1,20 que é um valor dentro da região de aceitação já que o t crítico é 2,77, descartando a amostra de Dourado do mar, com conta dos valores se apresentarem muito diferentes. Mesmo assim, os dois métodos são estatisticamente equivalentes para quantificação deste metal, já que esta diferença na amostra dourado do mar pode ter ocorrido por erros de manipulação.

As concentrações de magnésio não apresentaram diferenças significativas já que o t calculado (2,33) está dentro de região de aceitação para um t critico igual a 2,77. Para a realização do teste t tabelado foram retiradas as concentrações da amostra de Merluza a qual apresentou uma diferença muito grande entre os dois métodos que pode ter ocorrido por erro do analista.

O zinco por sua vez apresentou um t calculado -2,98, ou seja, está fora da região de aceitação, pois o t critico é 2,77, portanto existem diferenças estatísticas entre a solubilização alcalina com TMAH e a digestão por via úmida para

determinação de zinco. Isso pode ter ocorrido pelo fato do Zn ter sofrido algum tipo de interferência em meio básico.

A metodologia de solubilização alcalina com TMAH foi aplicada nas amostras certificadas Tort-3 (hepatopâncreas de lagosta), Dolt-4 (fígado de peixe) e ERM-CE 278 (tecido de mexilhão) com a finalidade de confirmar a validação dos resultados encontrados na determinação de Fe e Zn, já que não apresentam o valor certificado de Ca e Mg. As concentrações encontradas estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação de Fe e Zn em material de referência certificado tratadas com TMAH auxiliado por ultrassom.

	Concentração (µg g^{-1})		
	Tort-3	**Dolt-4**	**ERM-CE 278**
Valor encontrado de Fe	169,29 ± 1,83	1754,83 ± 27,50	176,08 ± 10,14
Valor certificado de Fe	179 ± 8	1833 ± 75	NC
Valor encontrado de Zn	17,56 ± 1,12	121,96 ± 2,80	91,08 ± 9,08
Valor certificado de Zn	136 ± 6	116 ± 6	83.1 ± 1,7

NC = não possui valor certificado

As concentrações de ferro na amostra Tort-3 se apresentou estatisticamente diferente ao valor de referência num nível de confiança de 95%, pois o t calculado (-4,60) está fora da região de aceitação (t crítico = 4,30). A Dolt-4 por sua vez, possui concentrações de ferro estatisticamente iguais já que o t calculado (-2,46) menor que o t crítico (4,30).

O zinco encontrado nas amostras Dolt-4 e ERM-CE 278 foram iguais estatisticamente, pois na primeira o t calculado foi 0,76 e no segundo foi 1,84 valores inferiores ao t critico (4,30). A amostra Tort-3 apresentou concentração de zinco quase dez vezes menor que o valor certificado, o que pode ter ocorrido por interferências da matriz da amostra.

5.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NAS AMOSTRAS DE PEIXES

As amostras de peixes coletadas no comercio de Jequié-BA foram avaliadas pela metodologia de solubilização alcalina desenvolvida e apresentaram as quantidades dos metais Ca, Fe, Mg e Zn apresentadas na Tabela 9. O teor de umidade das amostras foi determinado, o qual apresentou umidade média de aproximadamente 85%.

As concentrações de cálcio nas amostras de peixes variaram entre 142 a 735 µg g^{-1}, sendo Merluza e Panga as espécies que apresentaram as maiores quantidades desse metal, enquanto o Abadejo apresentou a menor concentração. O ferro apresentou concentrações variando entre 11,89 e 137,0 µg g^{-1}, nas espécies Linguado e Dourado do Mar, respectivamente.

As amostras apresentaram concentrações de magnésio variando entre 88,94 e 225,92 µg g^{-1}, sendo a amostra de Polaca do Alasca a que exibiu maior quantidade de magnésio. As amostras apresentaram concentrações de zinco entre 5,37 e 8,08 µg g^{-1}, a espécie que possui a menor quantidade foi o PAnga, já o Linguado e o Dourado do Mar tiveram as maiores concentrações.

Como estes são elementos essenciais também para os seres vivos é aceitável que estes apresentem quantidades significativas. A ANVISA, através da Portaria n° 685, de 27 de agosto de 1998, regulamenta a concentração de zinco em peixes, sendo o valor aceitável é de até 50 µg g^{-1}, deste modo, as amostras de peixes possuem quantidades de zinco aceitáveis. A legislação brasileira não regulamenta os outros metais analisados.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) apresenta a composição dos principais alimentos consumidos no Brasil e nela foi possível identificar a quantidade de Ca, Mg, Fe e Zn de amostras de Abadejo e Merluza coletadas em várias regiões brasileiras.[65] A quantificação desses metais foi por meio da técnica de espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e as concentrações estão expostas na Tabela 11.

Tabela 11. Composição mineral das amostras de diferentes regiões pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.

	Quantidade em µg g^{-1}			
Amostra	**Ca**	**Fe**	**Mg**	**Zn**
Abadejo	100	140	1	4
Merluza	200	270	2	3

Comparando as concentrações dos minerais apresentados pela TACO (Tabela 11) com as concentrações encontradas nas amostras das mesmas espécies de peixes adquiridas do município de Jequié (Tabela 9), notou-se que as concentrações de cálcio, magnésio e zinco encontradas nas amostras foram superiores aos expostos na TACO, já a quantidade de ferro foi inferior. Essas variações podem ter ocorrido devido a diferentes fatores ambientais.

6. CONCLUSÕES

O planejamento experimental Doehlert permitiu a otimização das principais variáveis envolvidas no processo de solubilização de amostras (tempo de sonicação, volume de TMAH e temperatura do banho ultrassônico) para determinação dos analitos Ca, Fe, Mg e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama.

Os parâmetros de mérito avaliados se apresentaram satisfatórios, mas vale destacar que os limites de detecção e quantificação do cálcio foram 24 e 56 µg g^{-1}, do ferro 6,8 e 12 µg g^{-1}, do magnésio 32 e 107 µg g^{-1} e do zinco 0,87 e 2,9 µg g^{-1}, respectivamente. A linearidade e a reprodutibilidade demonstraram que esta nova metodologia é confiável para determinação de metais em amostras de filé de peixes.

A exatidão do método foi avaliada através da aplicação do método de solubilização alcalina nos materiais de referência certificado Tort-3, Dolt-4 e ERM-CE 278, o qual apresentou concentrações estatisticamente semelhantes num nível de confiança de 95%, com exceção das concentrações de ferro e zinco na amostra Tort-3.

A partir da avaliação de todos os parâmetros pode-se concluir que o método de solubilização alcalina utilizando o reagente TMAH auxiliado por energia de ultrassom se mostrou eficiente, rápido e econômico para digerir amostras de filé de peixes.

As condições ótimas foram aplicadas nas amostras de peixes adquiridas no comércio de Jequié, as quais apresentaram concentrações de cálcio variando entre 142,3 a 735,2 µg g^{-1}, de ferro entre 11,89 e 137,05 µg g^{-1}, de magnésio entre 88 e 225 µg g^{-1} e de zinco entre 5,37 e 8,08 µg g^{-1}. Comparando os resultados com os métodos de digestão ácida as concentrações dos metais Ca, Mg e Fe se apresentaram estatisticamente equivalentes, apenas o Zn apresentou diferença significativa.

A legislação brasileira regulamenta apenas a quantidade de zinco em peixes sendo que o valor aceitável é de até 50 µg g^{-1}, o que demonstra que todas as amostras estavam adequadas para o consumo, pois apresentou concentração inferior.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectiva se faz necessário a realização outros estudos para determinar o que causou as baixas recuperações de zinco em algumas amostras.

Aplicação dessa metodologia para determinação dos quatro analitos estudados (Ca, Fe, Mg e Zn) em outras amostras reais, visando a ampliação da aplicabilidade de uma metodologia barata e mais rápida.

Estudar a possibilidade de digerir mais amostras no banho de ultrassom de uma só vez sem que haja alterações significativas entre as amostras e assim acelere ainda mais o processo de solubilização alcalina.

8. REFERÊNCIAS

[1] JAIME, P.C. *et. al.* **Prevalência e distribuição sociodemográfica de marcadores de alimantação saudável, Pesquisa Nacional de Saúde***, Brasil 2013.* Epidemiol, v.24, n.2, p.267-276, 2015.

[2] FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde. The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges, p.243, 2014.

[3] PINHEIRO, D. M. PORTO, K. R. A. MENEZES, M. E. S. **A química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais.** Maceió: EDUFAL, 2005.

[4] FANI, M. **A importância dos alimentos minerais na alimentação. Revista Aditivos & Ingredientes**, Abril, 2015.

[5] KEHRING, H. A. COSTA, M. MALM, O. **Estudo da contaminação por metais pesados em peixes e mexilão da baia de Guanabara – Rio de Janeiro.** Tropical Oceanography, Recife, v. 35, n. 1, p. 32-50, 2007.

[6] OLIVEIRA, E. **Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends.** JBCS, v.14, n.2, p. 174-182, 2003.

[7] VANECARSTEELE, C.; BLOCK, C. B. **Modern methods for trace element determination.** New York: John Wiley e Sons. 1993.

[8] SILVA, C. S., NUNES, A. M. ORESTE, E. Q. ACUNHA, T. S. VIEIRA, A. M. RIBEIRO, A. S., **Evaluation of sample preparation methods based on alkaline and acid solubilization for the determination of Na and K in meat samples by atomic spectrometric techniques.** JBCS, v.23, n.9, p.1623-1629, 2012.

[9] NOBREGA, J. A. et al. **Sample preparation in alkaline media**. Spectrochimia Acta, Part B, n. 61, p.465-495, 2006.

[10] BARROS, J. M.; BEZERRA, M. A.; VALASQUES, G. S.; NASCIMENTO, J. B. B.; SOUZA, A. S.; ARAGÃO, N. M. **Multivariate Optimization of an Ultrasound-assisted Extraction Procedure for Cu, Mn, Ni and Zn Determination in Ration to Chickens**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 85, n. 3, p. 891-902, 2013.

[11] MARTINES, M. A. U.Ç DAVOLOS, M. R.Ç JAFELICCI JR, M. **O efeito do ultra-som em reações químicas.** Química Nova, v. 23, p. 251-256, 2000.

[12] NUNES, M. A. *et. al.* **Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in Fresh and Processed Meat Treated withTetramethylammonium Hydroxide by Atomic Absorption Spectrometry.** Sociedade Brasileira de Química, Vol. 22, No. 10, p.1850-1857, 2011.

[13] MONPERRUS, M., POINT, D. CHAUVAUD, L. AMOUROUX, D. BAREILLEA, G., DONARDA, O. **Determination of metal and organometal trophic bioaccumulation in the benthic macrofauna of the Adour estuary coastal zone (SW France, Bay of Biscay).** Journal of Environmental Monitoring, v.7, p.693-700, 2005.

[14] LEITE, C. E., **Nutrição e Doença:** Um estudo da conexão entre alimentos e moléstias**.** Instituição Brasileira de Difusão Cultural. São Paulo, 2ª Ed. 1987. p. 33.

[15] COTTA, R. M. M. REIS, R. S., BATISTA, K. C. S. DIAS, G. ALFENAS, R. C. G. CASTRO, F. A. F. **Hábitos e práticas alimentares de hipertensos e diabéticos: repensando o cuidado a partir da atenção primária**. Revista de Nutrição, V.22, n.6, p. 823-835, 2009.

[16] NOVAES, C. G., NETO, J. H. S., LEDO, P. F. SANTOS, M. J. S. SANTOS, B. G. RIBEIRO, J. P. **Determinação de Ca, Fe, K, Mg e Zn em frutos de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) usando Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente.** Exatas online, vol.6, n.2, p. 11-20, 2015.

[17] LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão concisa** – tradução da 5ª edição inglesa. São Paulo, Edgard Blucher, 1999.

[18] SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C., **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 9.ed. p.169-192, 1999.

[19] BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 80, de 13 de dezembro de 2004.

[20] COZZOLINO, S. M. F. **Deficiências de minerais. Estudos Avançados**. vol. 21, São Paulo, maio/agosto, 2007.

[21] LANFER-MARQUEZ, U. M. **O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 39, n. 3, p. 227-242, 2003.

[22] JUNIOR, J. F. **Magnésio na Medicina de Emergência**. Associação Brasileira de Medicina Biomolecular e Nutrigenôntica, 2011.

[23] CAMPOS, M. J. A. Departamento de microbiologia Universidade de São Paulo. **Ferro (Fe)**. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=45&Itemid=52&lang=en> acessado em: 20 de nov. de 2016.

[24] OLIVEIRA, C. P. M. S. Fundação medico-cultural de gastroenterologia e nutricação de São Paulo (USP). **Zinco**. Disponível em:<http://www.fugesp.org.br/nutricao_e_saude_conteudo.asp?id_publicacao=3&edicao_numero=6&menu_ordem=2> acessão em: 25 de nov. de 2016.

[25] BARRETO, M. S. et. al. **Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde**. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v.14, n.1, p. 41 – 68. 2005.

[26] LOPES, I. G., OLIVEIRA, R. G., RAMOS, F.M. **Perfil do consumo de peixes pela população brasileira**. Biota Amazonia**,** v.6, n.2, p. 62-65, 2016.

[27] NIEKRASZEWICZ, L. A. B. **Embalagens metálicas e alimentos: o caso do atum enlatado.** 2010. 65 f. Dissertação (Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2010.

[28] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25/06/1962, nº 1.236 de 02/09/1994, nº 1.812 de 08/02/1996, nº 2.244 de 04/06/1997 e nº 6385 de 27/02/2008. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 27 fev. 2008.

[29] BEZERRA, M. A. **Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de absorção atômica com chama.** 2003. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Química) – Câmara de Pós-Graduação, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2003.

[30] FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos.** 1ª ed. Salvador: Vento Leste, 2015, 190p.

[31] NETO, B. B. SCARMINIO, I. S., BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 2ª Ed. Campinas, SP, 401p. 2004.

[32] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial.**Química nova**,** v.29, n.2, p.338-350, 2006.

[33] BARRETO, J. A. **Um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado usando duplo reator enovelado para a determinação de chumbo e manganês em amostras de chás por FAAS.** 2016. 95f. Dissertação (Mestrado

em Química Analítica) – Programa de pós-graduação em Química, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié-BA, 2016.

[34] LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. **Experimental design and optimization**. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**,** v.42, n.x, p.3–40, 1998.

[35] FILHO, E. R. P. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. 1ª Ed. 83p.

[36] CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica.** E-papers, Rio de Janeiro, 2003.

[37] LEARDI, R. **Experimental design in chemistry: A tutorial**. Analytica ChimicaActa, v.652, p.161–172, 2009.

[38] BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry**. Talanta**,** v.76, n.5, p.965-977, 2008.

[39] NOVAES, C. G. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais.** 2011. 195 f. Tese (Colegiado de Pós-graduação em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2016.

[40] DOEHLERT, D. H. **Uniform shell designs.** Aplied Statistics, v.19, n.3, p.231- 239, 1970.

[41] FERREIRA, S. L. C.; dos SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. **Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review**. Talanta**,** v.63, n.4, p.1061-1067, 2004.

[42] CAMPANÃ, A. M. G. RODRÍGUEZ, L. C. GONZÁLEZ, A. L. BARRERO, F. A. CEBA, M. R. **Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs.** Analitica Chimica Acta, v.348, n.9, p. 237-246, 1997.

[43] SANTOS, A. M. P., JESUS, R. M., CAVALCANTE, D. D. FERREIRA, H. S., SANTOS, W. N. L., FERREIRA, S. L. C. **Validação de procedimento de digestão para determinação de cádmio e chumbo em produtos derivados de uva**. In. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32. 2009. Fortaleza-CE. Livros de resumos. Sociedade Brasileira de Química. 2009.

[44] PINHEIRO, A. C. A., LISBOA, M. T., RIBEIRO, A. S., NUNES, A. M., YAMASAKI, A. **Avaliação da mineralização de arroz em sistema de refluxo para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS**. Química Nova, vol.37, n. 1, p. 6-9, 2014.

[45] MESTER, Z. STURGEON, R. **Sample preparation for trace element analysis**, Elseveir. 2003.

[46] LEE, C. H., WANG, C. L., LIN, H. F. CHAI, C. Y. HONG, Y. M. HO, C. K. **Toxicity of tetramethylammonium hydroxide: Review of two fatal cases of dermal exposure and development of an animal model.** Toxicology and Industrial Health, vol.27, n.6, p.497-503, 2011.

[47] MONPERRUS, M. POINT, D. GRALL, J. CHAUVAUD, L. AMOUROUX, D. GILLES, B. DONARD, O. **Determination of metal and organometal trophic bioaccumulation in the benthic macrofauna of the Adour estuary coastal zone (SW France, Bay of Biscay).** The Royal Society of Chemistry , Vol.7, p.693-700, 2005.

[48] TORRES, D. P. FRESCURA, V. L. A. CURTIUS, A. J. **Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment.** Microchemical Journal, v.93, p.206-210, 2009.

[49] BATISTA, B. L., RODRIGUES, J. L. NUNES, J. A., TORMEN, L. CURTIUS, A. J. BAROSA, F. **Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS**. Talanta, v.76, p.575-579, 2008.

[50] SILVA, R. G. L. WILLIE, S. N. STURGEON, R. E. SANTELLI, R. E. SELLA, S. M. **Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry.** The Royal Society of Chemistry, vol.124, p. 1843-1846, 2009.

[51] MONTEIRO, M. A. N. A., MUÑOZ, R. A. A. **MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE EM BIODIESEL APÓS EXTRAÇÃO EM BANHO DE ULTRASSOM.** Horizonte Científico, v. 5, nº 1, 2011. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/8122/0>. Acessado em: 19 de jan de 2017.

[52] FERREIRA, B. L.; CHAVES, E. S.; VIALICH, J. **Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó.** Brazilian Journal of Food Technology.v.17 n.3 Campinas Jul/Set. 2014.

[53] OLIZ, C. M., PEREIRA, C. C., VIEIRA, M. A., RIBEIRO, A. S., NUNES, A. N. **Avaliação de tratamentos da amostra em microescala para a determinação de K, Mg, Na e Zn em carnes por técnicas de espectrometria atômica.** Revista Química Nova, Vol.36, No.7, p.972-977, 2013.

[54] OLIVEIRA, F. M. **Controle de qualidade analítica**. LABWIN – Serviços Especializados LTDA. p.24, 2006. Disponível em: <http://labwin.com.br/artigos/curso_cqa_validacoes.pdf>. Acesso em: 02 de jan de 2017.

[55] REIS, R. A. **Desenvolvimento de equipamento multifuncional portátil de baixo custo para determinações fotométricas, turbidimétricas, nefelométricas e**

fluorimétricas. 2014. 72 f. Dissertação (Instituto de Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2014.

[56] Khouja, H. **Turbifimetry & Nephelometry**. Diponível em: <http://www.kau.edu.sa/Files/0013791/Subjects/Turbidimetry%20and%20Nephelometry.pdf>, Acesso em: 08 de jan de 2017.

[57] FILHO, E. R. P. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. EDUFSCar. 2015.

[58] VALDERRAMA, P. BRAGA, J. W. B. POPPI, R. J. **Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada.** Revista Química Nova, Vol. 32, n.5, p.1278-1287, 2009.

[59] BRASIL. Ministério da Saúde. Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003.

[60] BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 01, 2003.

[61] BRITO, N. M. et. al. **Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão.** Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente. Curitiba-PR, Vol.13, p.129-146, 2003.

[62] ROCA, M. F. et. al. **Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos.** Revista Brasileira de Farmácia, Vol.88, n.04, p. 177-180, 2007.

[63] SILVA, S. G. **Desenvolvimento de procedimentos limpos para extração de íons metálicos em ponto nuvem.** Dissertação (mestrado em química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2008.

[64] BACAN, N. et.al. **Química Analítica quantitativa elementar**. Campinas-SP. Edgard Bucher. 1979.

[65] UNICAMP. NEPA. Tabela brasileira de composição de alimentos. Campinas-SP. 4ª ed. 161 p. 2011.