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

IVANA LAGO DA SILVA ROMÃO

Desenvolvimento de método utilizando ácido nítrico diluído visando a determinação de micro e macronutrientes em diferentes espécies de maracujá (*Passiflora* L.) produzidas na região Sudoeste da Bahia

JEQUIÉ – BA
FEVEREIRO / 2015

IVANA LAGO DA SILVA ROMÃO

Desenvolvimento de método utilizando ácido nítrico diluído visando a determinação de micro e macronutrientes em diferentes espécies de maracujá (*Passiflora* L.) produzidas na região Sudoeste da Bahia

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 Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

JEQUIÉ – BA
FEVEREIRO / 2015

Romão, Ivana Lago da Silva.
R668

Desenvolvimento de método utilizando ácido nítrico diluído visando a determinação de micro macronutrientes em diferentes espécies de maracujá (Passiflora L.) produzidas na região Sudoeste da Bahia/Ivana Lago da Silva Romão.- Jequié, UESB, 2015.

58 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação (Pós-graduação em Química)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015. Orientador: Profº. Drº. Cleber Galvão Novaes.

1. Maracujá (Passiflora L. – Determinação de micro e macronutrientes em diferentes espécies produzidas na região Sudoeste da Bahia 2. Maracujá (Passiflora edulis f. Flavicarpa e Passiflora cincinnata) – Utilização de ácido nítrico diluído para determinação de micro e macronutrientes em espécies cultivadas na região Sudoeste da Bahia 3. Nutrientes em espécies de maracujá – Análise por componentes principais (PCA) e redes neurais 4. Nutrientes em diferentes espécies de maracujá – Quantificação por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

CDD – 543

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUIMICA-PGQUI

Ivana Lago da Silva Romão

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **23/02/2015.**

Comissão Examinadora:

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

Prof. Dr. Anderson Santos Souza (UFBA, Salvador, 2008)

Profa. Dra. Anaildes Lago de Carvalho (UFBA, Salvador, 2014)

Esta dissertação é dedicada a Deus e às três pessoas que eu mais amo e que me fazem motivada a orgulhá-los: meus pais Roque e Valdete, que me deram a essência e me ensinaram a lutar e valorizar as conquistas; e ao meu esposo Danyel, por todo amor, apoio e incentivo... sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou essa maravilha de experiência.

À minha família por todo amor e amparo.

Ao meu esposo Danyel que sempre esteve ao meu lado, incentivando e apoiando minhas escolhas.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela oportunidade concedida. Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes, pela confiança, amizade, orientação, ensinamentos e por ter acreditado na realização deste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica, Berlane e Jéssica, pelos dias inteiros dedicados à pesquisa e companhia no laboratório, meus sinceros agradecimentos. À Márcio por todos os momentos de atenção e ajuda no manuseio do ICP OES.

Aos meus amigos do curso e de trabalho no laboratório: Marla, Caio, Darlen, Leane, Jeferson, que me ensinaram muito e fizeram do espaço da universidade um lugar bom e agradável de se viver.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Química da UESB, dos quais cito o Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos, Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra, Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos (UESC), Profª. Drª. Sulene Araújo e demais professores aqui não citados.

Ao Laboratório de Química Analítica (LQA) da UESB, sob a coordenação do Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos, que concedeu os espaços e recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio e incentivo à pesquisa e ainda pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou este trabalho.

A todos os colegas do LQA aqui não citados, muito obrigada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Ilustração dos frutos das espécies de *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora cincinnata*.....	4
Figura 2.	Ilustração da flor e fruto das espécies *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora cincinnata*.....	6
Figura 3.	Ilustração da parte interna dos frutos *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora cincinnata*.....	8
Figura 4.	Esquema de montagem da tocha e espiral de indução.....	12
Figura 5.	Mapa geográfico da região sudoeste da Bahia.....	20
Figura 6.	Gráfico do estudo da potência.....	22
Figura 7.	Gráfico de estudo da vazão do fluxo de nebulização.....	24
Figura 8.	Gráfico de estudo da vazão do gás auxiliar.....	25
Figura 9.	Gráfico de estudo da vazão do gás do plasma.....	26
Figura 10.	Gráficos de comparação de concentração para o maracujá-amarelo e maracujá-verde.....	35
Figura 11.	Scree-plot para os dados provenientes da análise elementar das amostras de polpa, semente e casca das espécies de *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora cincinnata*.....	39
Figura 12.	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 para as amostras de polpa, semente e casca das espécies de Passiflora edulis f. flavicarpa e Passiflora cincinnata.....	40
Figura 13.	Gráfico dos loadings para PC1 e PC2.....	41
Figura 14.	Mapa de grupos de amostras (polpa, semente e casca) obtido por redes neurais de Kohonen.....	42
Figura 15.	Mapa de distribuição das variáveis individuais obtidas pela rede neural de Kohonen.....	43

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1.	Produção brasileira de maracujá em 2012.....	7
Tabela 2.	Produção brasileira de maracujá por região em 2012.....	7
Tabela 3.	Teor de nutrientes em cascas in natura de maracujá amarelo (*P. edulis f. Flavicarpa*).....	8
Tabela 4.	Condições de operação do espectrômetro de emissão.....	17
Tabela 5.	Elementos estudados e suas respectivas linhas analíticas.....	18
Tabela 6.	Parâmetros otimizados para o ICP OES.....	27
Tabela 7.	Coeficientes de determinação e faixa dinâmica linear obtida a partir do método desenvolvido por ICP OES.....	29
Tabela 8.	Limites de detecção e quantificação dos elementos determinados por ICP OES.....	30
Tabela 9.	Recuperações obtidas para os elementos analisados.....	31
Tabela 10.	Concentrações (μg g^{-1}) dos elementos estudados nas amostras de polpa, semente e casca do maracujá amarelo.....	33
Tabela 11.	Concentrações (μg g^{-1}) dos elementos estudados nas amostras de polpa, semente e casca do maracujá verde.....	34
Tabela 12.	Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do maracujá amarelo.....	37
Tabela 13.	Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do maracujá verde.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis;
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama;
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry;*
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica;
ICP-MS	Espectrometria de massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry;*
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry;*
LD	Limite de detecção;
LQ	Limite de Quantificação;
NPK	Nitrogênio, Fosforo e Potássio;
PCA	Análise de Componentes Principais;
PCs	Componentes Principais;
RF	Radiofrequência;
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.

Desenvolvimento de método utilizando ácido nítrico diluído visando a determinação de micro e macronutrientes em diferentes espécies de maracujá (*Passiflora* L.) produzidas na região Sudoeste da Bahia

Autora: Ivana Lago da Silva Romão
Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

RESUMO: O maracujá é conhecido popularmente por possuir propriedades sedativas e ser um fruto rico em vitaminas, além do seu alto teor de potássio. O Brasil é considerado um dos maiores produtores, por possuir clima propício para esse cultivo, sendo o maracujá amarelo a espécie mais cultivada e a mais adaptada aos dias quentes. O maracujá verde é uma fruta nativa das áreas secas do nordeste, caracterizada por seu sabor e por ser resistente a longos períodos de estiagem. O presente trabalho visou a quantificação de Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn na polpa, semente e casca de duas espécies de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora cincinnata)* coletadas em cinco municípios da região Sudoeste da Bahia. A quantificação foi feita por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Para a digestão das amostras foi otimizado um método utilizando ácido nítrico diluído (4,0 mol/L) e peróxido de hidrogênio. Os principais parâmetros de operação do ICP foram avaliados e as melhores condições encontradas foram: potência de radiofrequência – 1.300 W; vazão de fluxo de nebulização – 0,80 L/min; vazão do gás auxiliar – 0,70 L/min e vazão de argônio do plasma – 12,0 L/min. O método foi avaliado através das seguintes figuras de mérito: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. Recuperações entre 90 e 122 % foram obtidas para a adição de 0,50 e 1,00 mg/L de analito. Nas amostras, as maiores concentrações foram encontradas para o maracujá amarelo. Os resultados foram tratados aplicando análise por componentes principais (PCA) e redes neurais, com ambos mostrando a formação clara de três grupos, correspondendo às partes do fruto analisados (polpa, semente e casca). Esses resultados são importantes para complementar a tabela de composição química dos alimentos consumidos pela população e para estimular a utilização de todas as partes do fruto na dieta alimentar.

Palavras – chave: Redes neurais, Maracujá, ácido diluído, ICP OES, PCA.

Method development using diluted nitric acid for determination of micro and macronutrients in different species of passion fruit (*Passiflora* L.) produced in the Southwest Bahia region

Author: Ivana Lago da Silva Romão
Advisor: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

ABSTRACT: Passion fruit is popularly known for sedative properties and is rich in vitamins apart from its high potassium concentration. Brazil is considered one of the largest producers, because it has favorable climate for this crop, with the yellow passion fruit the most cultivated species and the most adapted to the hot days. Green passion fruit is a fruit native of dry northeastern areas, characterized by its taste and resistance to long periods of drought. This study aimed to quantify Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na and Zn in the pulp, seed and peel of two species of passion fruit (*Passiflora edulis f. Flavicarpa and Passiflora cincinnata*) collected in five cities in the southwest of Bahia. Quantification was performed by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES). A method was optimized for the digestion of samples using diluted nitric acid (4.0 mol L^{-1}) and hydrogen peroxide. The main operating parameters of the ICP were evaluated and the best conditions were: RF power - 1300 W; nebulizer gas flow - 0.80 L min^{-1}; auxiliary gas flow - 0.70 L min^{-1} and plasma gas flow - 12.0 L min^{-1}. Some figures of merit also were evaluated: linearity, limit of detection, limit of quantification and accuracy. Recoveries between 90 and 122% were obtained for the addition of 0.50 and 1.00 mg L^{-1} of analyte. In the samples, the highest concentrations were found for the yellow passion fruit. Principal component analysis (PCA) and neural networks were applied to the data, and both showed the clear formation of three groups, corresponding to parts of the fruit analyzed (pulp, seed and peel). These results are important to supplement the chemical composition table of the food consumed by the population and to stimulate the use of all parts of the fruit in the diet.

Keywords: Neural networks, passion fruit, diluted acid, ICP OES, PCA.

SUMÁRIO

1 Introdução..... 1
1.1 Maracujá (*Passifloraceae*)..... 3
1.1.1 Características, produção e consumo..... 4
1.1.2 Nutrientes e usos medicinais..... 6
1.2 Importância da análise de alimentos..... 8
1.3 Técnicas analíticas aplicadas na análise de alimentos..... 9
1.3.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente Acoplado..... 10
1.4 Digestão com ácido diluído..... 12
1.5 Técnicas de tratamento de dados..... 14
1.5.1 Análise de Componentes Principais..... 14
1.5.2 Redes Neurais..... 14
2 Objetivos..... 15
2.1 Objetivo geral..... 15
2.2 Objetivos específicos..... 15
3 Parte Experimental..... 16
3.1 Especificações dos equipamentos e materiais..... 16
3.2 Instrumentação..... 16
3.3 Preparo de soluções..... 17
3.3.1 Soluções de ácido nítrico..... 17
3.3.2 Solução multielementar de Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn para estudo dos parâmetros instrumentais..... 17
3.4 Otimização dos parâmetros de operação do ICP OES..... 18
3.5 Coleta das amostras..... 18
3.6 Otimização do procedimento de digestão..... 19
3.6.1 Digestão das amostras..... 19
3.7 Tratamento dos dados..... 20
4. Resultados e Discussão..... 21
4.1 Otimização dos parâmetros instrumentais..... 21

4.1.1 Estudo da potência de radiofrequência..... 21
4.1.2 Estudo da vazão de fluxo de nebulização..... 22
4.1.3 Estudo da Vazão do gás auxiliar..... 23
4.1.4 Estudo da vazão do gás do plasma..... 24
4.2 Digestão com ácido diluído..... 25
4.3 Figuras de mérito..... 25
4.3.1 Linearidade..... 25
4.3.2 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)..... 26
4.3.3 Teste de exatidão (validação)..... 27
4.4 Análise das amostras de maracujá..... 28
4.5 Tratamento dos dados usando análise de componentes principais... 31
4.6 Tratamento dos dados usando análise por redes neurais artificiais... 36
5 Conclusão..... 38
6 Perspectivas..... 39
Referências Bibliográficas..... 40

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um clima favorável para o plantio de uma grande diversidade de árvores frutíferas. O interesse por frutos resistentes às variações climáticas e com alto valor nutricional tem despertado o interesse dos pesquisadores. O conhecimento das características do fruto e sua composição mineral são de grande importância para estabelecer os valores nutricionais essenciais para o bom funcionamento do organismo.

Os minerais são elementos inorgânicos, muitos deles indispensáveis para nutrição do corpo humano, por promover a constituição dos ossos, dentes, músculos, sangue, células nervosas e a manutenção do equilíbrio hídrico no corpo [1]. Entretanto, alguns elementos presentes no ambiente entram facilmente na cadeia alimentar podendo se tornar um risco para a saúde humana.

Esses minerais não são sintetizados pelo organismo humano, por isso precisam ser obtidos através da alimentação. Os alimentos naturais de origem vegetal, como frutas, legumes, hortaliças e verduras são as principais fontes de minerais. Diversos estudos foram e vêm sendo desenvolvidos [2, 3], visando à caracterização da composição química desses alimentos, a fim de auxiliar médicos e nutricionistas na formulação de dietas terapêuticas e para educação nutricional da população.

Apesar dos avanços, as tabelas brasileiras de composição dos alimentos possuem poucos dados, que se baseiam em trabalhos realizados no exterior e não enfocam as variedades nacionais. Além disso, traçar o perfil nutricional dos alimentos não se resume apenas em, coletar e analisar um ou dois alimentos e dispor os dados obtidos em uma tabela de composição de alimentos. Quando se analisa um alimento de origem vegetal, por exemplo, algumas características relevantes como a variação sazonal (estações do ano, clima, períodos chuvosos e não chuvosos), regional (tipo de solo ou localização geográfica) e em especial a forma de cultivo (convencional, orgânico e/ou estágio de maturação) precisam ser avaliadas e levadas em consideração. Isso indica a necessidade de elaboração de uma tabela de composição nutricional local que abranjam essas peculiaridades [4, 5, 6].

As formas de cultivo dos vegetais, por exemplo, podem contribuir com informações relevantes quando se analisa o fruto. Nas culturas convencionais o cultivo ocorre com adição de produtos químicos como, agrotóxicos e fertilizantes artificias. Nas

culturas orgânicas o cultivo ocorre sem uso de agrotóxicos e com uso de fertilizantes naturais, como o húmus. Entre os benefícios do uso de adubação orgânica estaria o fornecimento de nutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes pela decomposição, pelo processo de mineralização e adsorção no húmus; além da redução da acidez do solo, que contribui para aumentar a disponibilidade de vários nutrientes e para tornar indisponível, por exemplo, o Al e o Mn [6].

Entre os diversos alimentos existentes, as frutas podem ser consideradas uma das mais importantes fontes de nutrição humana além de ser de fácil acesso a todos os níveis sociais. Os frutos contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes como minerais, fibras e vitaminas, diversos compostos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis [7]. Dentre os mais variados frutos existentes o maracujá (Passifloraceae*)* vem se destacando pela sua resistência a variações climáticas. A Passifloraceae representa uma família botânica com grande diversidade natural, sendo o Brasil um dos centros de diversidade, concentrando grande número de espécies. A farinha de maracujá, com seu alto teor de fibras solúveis e insolúveis, é considerada um alimento funcional, uma vez que auxilia na redução do colesterol e remoção de placas de gorduras das artérias, inibindo o risco de doenças cardiovasculares [8].

São escassos trabalhos com dados sobre a real composição química deste fruto. Por isso este trabalho consiste em avaliar a composição mineral da casca, semente e polpa de duas espécies de maracujás oriundos das cidades de Itiruçú, Jaguaquara, Jequié, Lafaiete Coutinho e Maracás, localizadas na região sudoeste da Bahia, usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), onde foram otimizados parâmetros como potência de radiofrequência (RF), vazão de nebulização, vazão do gás do plasma e vazão do gás auxiliar. O método de digestão também foi estudado a fim de se obter uma condição envolvendo ácidos mais diluídos e reduzir a produção de resíduos. O trabalho apresenta informações químicas que servirão tanto para o cenário nacional com informações à cerca da composição nutricional destes alimentos, assim como para a população local, composta por pequenos e médios produtores que tem o maracujá como principal fonte de renda e aqueles que consomem frequentemente este fruto.

1.1 O Maracujá (Passifloraceae*)*

A primeira referência ao maracujá, no Brasil, foi em 1587 no Tratado Descritivo do Brasil como "erva que dá fruto". Porém, foi Nic Monardis quem, em 1569, descreveu a primeira espécie do gênero Passiflora, a saber, Passiflora. incarnata L., mas sob o nome de Granadilla. Essa planta, considerada extraordinária pela conformação de suas rubras flores, foi mandada de presente ao Papa Paulo V (1605-1621), que mandou cultivá-la com grande carinho em Roma e divulgar que ela representava uma revelação divina. Devido à beleza e à característica física de suas flores, a planta foi relacionada com a "Paixão de Cristo". Desse detalhe surgiu o nome do seu gênero botânico, sendo "passio" o equivalente a paixão e "flosoris" o equivalente a flor. No Brasil, já foram encontradas aproximadamente 150 espécies, a maioria para fins ornamentais e cerca de 60 produzindo frutos comestíveis. Embora o gênero agrupe muitas espécies, poucas são de importância, que é dada pela qualidade dos seus frutos, pelo aspecto ornamental ou pelas suas qualidades farmacológicas [9].

A correta identificação e caracterização torna possível conhecer melhor as espécies, inclusive quanto à sua distribuição. Relativamente, poucas espécies de Passifloraceae nativas do Brasil são mantidas em cultivo e existem espécies ameaçadas de extinção que são muito pouco conhecidas e não têm sido encontradas recentemente, inclusive na natureza [10]. A Figura 1 mostra as duas espécies do gênero *Passiflora* que foram estudadas neste trabalho.

Figura 1. *Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora cincinnata*.

1.1.1 Características, produção e consumo

Cultivada por suas características alimentícias, ornamentais e medicinais, o maracujazeiro é uma planta trepadeira de produção anual, de grande porte, lenhosa, vigorosa e de crescimento rápido, podendo atingir até 10 m de comprimento.

As espécies de maior interesse comercial são maracujá-amarelo ou maracujá-azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e o maracujá da caatinga ou maracujá verde (*Passiflora cincinnata)*. O maracujá-amarelo é o mais cultivado e comercializado no país devido à qualidade de seus frutos. Apresenta uma série de características consideradas superiores ao maracujá verde, tais como: maior tamanho dos frutos, peso, teor de caroteno e acidez total. Já o maracujá verde tem sua comercialização restrita, os frutos são nativos de áreas secas, suas flores são ornamentais geralmente roxa-escura [11].

O maracujá verde, é uma fruta nativa do semiárido nordestino, é resistente à seca e também a uma série de pragas que atingem o maracujá comum, é indicado por pesquisadores da Embrapa Semiárido como uma opção de cultivo para o desenvolvimento de uma fruticultura de sequeiro na região. A produção do maracujá verde demanda menos custos do que a do maracujá-amarelo. Sua casca é esverdeada e sua polpa branca, onde se escondem dezenas de sementes. O sabor da polpa é mais marcante em termos de doçura, mas também de acidez, do que o maracujá comum, além de ser extremamente aromático. Sua flor é belíssima e muito delicada, além de exalar um aroma adocicado que atrai as abelhas. O maracujá verde é amplamente conhecido pelas suas propriedades medicinais, em especial, por ter efeito calmante e relaxante. É uma rica fonte de potássio, ferro, fósforo, cálcio e vitaminas A, C e do complexo B, além de possuir valor medicinal, em função das suas propriedades terapêuticas: as folhas e o suco contém passiflorina, conhecido como um sedativo natural, e o chá preparado com as folhas, tem efeito diurético. Conhecido também pelo valor ornamental por suas belas flores, que são um atrativo devido ao seu tamanho, exuberância das cores e pela originalidade das formas. A combinação de nutrição com sabor e aroma fazem do maracujá verde matéria prima para produção de produtos como sucos, polpas, geleias e sorvetes [8,12].

O período de colheita do maracujá varia de seis a nove meses após o plantio de acordo com a região e condições climáticas. No nordeste, devido às características climáticas mais favoráveis o maracujazeiro produz durante um período maior em comparação com as regiões sul e sudeste. O ponto de colheita é caracterizado pela coleta dos frutos no chão. A coleta de frutos é feita de uma a três vezes por semana. Após colheita os frutos perdem peso rapidamente à medida que permanecem no chão ficam murchos dificultando a comercialização [13]. O maracujá-amarelo possui a película externa amarela, casca branca, formato arredondado, polpa ácida, suco amarelo a amarelo-alaranjado. O maracujá verde possui a película externa verde, com a casca branca, formato arredondado, polpa ácida, suco amarelo a amarelo claro. Sua ocorrência é frequente e espontânea na região semiárida do Nordeste Brasileiro, onde sua exploração ocorre basicamente de forma extrativista. A Figura 2 apresenta ilustrações da flor e do fruto das duas espécies em estudo.

Figura 2. (A) e (B) Flor e fruto do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). (C) e (D) Flor e fruto do maracujá verde (*Passiflora cincinnata*).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [14], a cultura do maracujá está concentrada nos estados do Pará, Bahia, Ceará, Sergipe e São Paulo. O maracujá tem conquistado cada vez mais os produtores e consumidores, por ser uma excelente fonte de renda para pequenos, médios e grandes produtores, podendo ser

cultivado em qualquer região do Brasil, com exceção as regiões com encharcamento e geadas. Na Tabela 1 estão apresentados os estados que mais produzem maracujá no Brasil, no ano de 2012.

Tabela 1. Produção brasileira de maracujá em 2012.

Estados	Área Colhida (ha)	Produção (t)
Bahia	29.938	320.945
Ceará	8.132	179.243
Minas Gerais	2.262	39.373
Sergipe	3.944	35.977
Espirito Santo	1.389	35.700
São Paulo	1.691	28.182
Pará	2.581	26.837
Outros	12.183	164.859
Brasil	57.848	776.097

Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2012.

A produção de maracujá é de grande importância para a economia brasileira, devido ao emprego intensivo de mão-de-obra, geração de renda, e principalmente pela colheita continuada da safra ao longo do ano. Além disso, seu cultivo pode ser realizado em vários estados brasileiros, posicionando o Brasil como maior produtor mundial. A Tabela 2 mostra a participação da área de cada região na produção de maracujá sendo o Nordeste a região de destaque na produção, em 2012.

Tabela 2. Produção brasileira de maracujá por região em 2012.

Região fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (t)
Nordeste	44.932	563.346
Sudeste	5.951	114.796
Norte	3.869	45.781
Centro-Oeste	1.766	32.792
Sul	1.330	19.382

Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2012.

1.1.2 Nutrientes e usos medicinais

Pesquisas estão sendo realizadas para avaliar o potencial do maracujá (casca, semente, polpa) para várias finalidades. A casca do maracujá é rica em fibras solúveis, niacina, vitamina B3, ferro, cálcio. Na Tabela 3 encontra-se o teor de nutrientes encontrados na casca do maracujá-amarelo *in natura* [15].

Tabela 3. Teor de nutrientes em cascas in natura de maracujá-amarelo (*P. edulis f. Flavicarpa*).

Parâmetros	Quantidade em 100 g de casca
Umidade	87,64 g
Cinzas	0,57 g
Lipídeos	0,01 g
Proteínas	0,67 g
Fibras	4,33 g
Carboidratos	6,78 g
Calorias	29,91 Kcal
Cálcio	44,51 mg
Ferro	0,89 mg
Sódio	43,77 mg
Magnésio	27,82 mg
Zinco	0,32 mg
Cobre	0,04 mg
Potássio	178,40 mg

As folhas e raízes do maracujazeiro contêm uma substância semelhante à morfina - a passiflorina. As folhas são usadas também para combater as febres intermitentes, as inflamações cutâneas e a erisipela. Além disso, o fruto é muito conhecido na medicina popular para o tratamento da ansiedade, insônia e irritabilidade. Além do uso na alimentação, o fruto também é indicado no combate a convulsões e às contrações musculares bruscas, na forma de infusão. Na Figura 3 observa-se a parte interna dos maracujás estudados neste trabalho.

Figura 3. Ilustração da parte interna dos frutos.

O maracujá possui muitas propriedades terapêuticas, entre elas encontra-se propriedade sedativa, emenogoga, anti-inflamatória, depurativa, vermífuga,

antiespasmódica, analgésica, ansiolítica e antialcoólica. Também é indicado para perturbação da menopausa, hipertensão arterial, excitação nervosa, estresse, hemorroidas e desequilíbrio do sistema nervoso central. Além de ser indicado para usuários de drogas, pois sua ação sedativa faz com que alcoólicos e drogados suportem melhor o desejo de usar drogas e ajuda a superar a ansiedade que os acompanha [16].

1.2 Importância da análise de alimentos

O conhecimento de hábitos alimentares saudáveis e noções de nutrição são importantes para a saúde e para manter uma boa qualidade de vida. Vários alimentos já possuem comprovação e muitos ainda estão sendo pesquisados a respeito de suas propriedades com características de levar à melhoria na qualidade de vida, promovendo auxílio na prevenção de doenças e manutenção da saúde de uma forma geral.

Práticas alimentares saudáveis são importantes para prevenir as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como a desnutrição, obesidade, diabetes, doenças cardíacas, hipertensão, câncer, anemia, hipovitaminose A, entre outras, que tem impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo e que podem ser fatais. No caso de doenças infecciosas uma boa alimentação permite que o sistema imunológico funcione bem, logo proporciona um aumento da resistência contra essas doenças [17].

Segundo Markert [18], quase todos os elementos químicos estão envolvidos em ciclos fechados na natureza, em concentrações que não causam efeitos nocivos aos organismos, movendo-se entre os vários compartimentos ambientais em velocidades e extensões variadas. Contudo, um dos aspectos mais graves da introdução de substâncias químicas nesses compartimentos é a sua bioacumulação na cadeia alimentar existente nos ambientes aquáticos e terrestres. Os gêneros alimentícios são uma das principais fontes de exposição do homem à contaminação por traços de metais. Alguns apresentam uma variedade de funções bioquímicas em todos os organismos vivos. Embora essenciais, no entanto, quando em excesso apresentam natureza potencialmente tóxica [19]. A depender da concentração e formas químicas, os metais podem ser considerados essenciais, terapêuticos, tóxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos, podem ainda provocar a destruição das células devido ao aumento da

produção de radicais livres no corpo, associado também à dificuldade de eliminação dessas substâncias tóxicas [20].

Segundo relatos do Projeto TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA/UNICAMP [21] o conhecimento da composição de alimentos consumidos nas diferentes regiões do Brasil é um elemento básico para ações de orientação nutricional baseadas em princípios de desenvolvimento local e diversificação da alimentação, em contraposição à massificação de uma dieta monótona e desequilibrada. O consumo de frutas e vegetais tem sido associado a uma menor incidência e mortalidade por diversas doenças crônicas não transmissíveis. A proteção que esses alimentos oferecem contra as enfermidades degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, está associado ao seu alto conteúdo de constituintes químicos com propriedades importantes, como as de antioxidantes (vitamina C, vitamina E, carotenoides e polifenóis) [22].

1.3 Técnicas analíticas aplicadas na análise de alimentos

A Química Analítica oferece subsídios e critérios sob o ponto de vista nutricional para a determinação da composição dos alimentos em relação aos macro e micronutrientes. Atualmente, os minerais, em especial os nutrientes essenciais, têm recebido especial atenção em estudos de avaliação nutricional devido ao uso crescente de técnicas analíticas que permitem o desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis, rápidos e precisos, atendendo às demandas de quantificação que dão suporte a essa área do conhecimento [23].

São vários os métodos analíticos utilizados na quantificação ou caracterização de metais em amostras de alimentos. Desde os métodos clássicos, como a gravimetria, a volumetria e outros, que por exigirem muito tempo na análise, recursos humanos intensivos e os seus limites de detecção não responderem às exigências da atualidade foram sendo substituídos aos poucos por métodos instrumentais tais como a cromatografia, espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectrometria de massas

com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), os métodos eletroanalíticos como a potenciometria, voltametria, entre outros.

Os métodos instrumentais, apesar de exigirem um forte investimento em equipamentos de custo elevado, são compensados pelas vantagens como versatilidade, sensibilidade, boa exatidão e precisão, fácil automação, aplicação em diferentes campos da ciência, ampla faixa linear, etc.

Dentre as diferentes técnicas, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado tem se destacado para a quantificação dos elementos minerais, por ser uma técnica multielementar e possibilitar a leitura com o mínimo tratamento das amostras, reduzindo de forma considerável o tempo e o custo das análises químicas [23].

1.3.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A determinação de baixas concentrações de metais e metaloides demanda a utilização de técnicas cada vez mais sensíveis e versáteis. A fim de satisfazer essas necessidades a espectrometria de emissão atômica vem sendo bastante utilizada para este fim. Esta técnica é baseada na emissão da radiação eletromagnética por uma espécie excitada após receber uma energia externa na forma de calor ou energia elétrica. Esta energia pode ser fornecida por um plasma, uma chama, uma descarga a baixa pressão ou um laser de potência.

O plasma é caracterizado por apresentar ionização parcial e ter uma elevada densidade de elétrons livres em movimento, em um processo onde ocorre transferência de energia por radiação. É formado em uma tocha de quartzo constituída por três tubos concêntricos com entradas independentes para cada seção anular. Na seção anular externa o gás é introduzido tangencialmente. Na seção anular intermediária entra o gás auxiliar para estabilizar o plasma [24]. Na Figura 4 é apresentado o esquema da montagem da tocha [25].

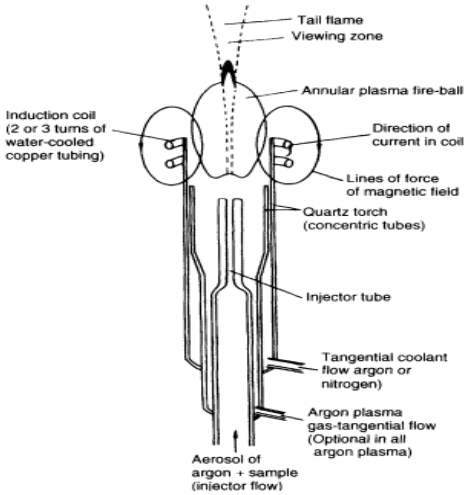

Figura 4. Esquema de montagem da tocha e espiral de indução.

No processo de formação do plasma, usa-se uma bobina Tesla, que proporciona descarga elétrica na região de entrada do argônio do plasma. Estes elétrons provocam as primeiras ionizações do argônio. Aumentando-se a energia na fonte de radiofrequência, os elétrons produzidos são acelerados pelo campo magnético, atingindo energia cinética elevada. Esta energia é transferida para outros átomos através de colisões, produzindo mais íons do gás e elétrons. Assim, inicia-se um processo em cascata até a formação do plasma [24]. Neste período, até atingir o ajuste entre a energia cedida pela fonte de RF e a utilizada no plasma, ocorre o processo de sintonização do acoplamento. A técnica denomina-se "*plasma com acoplamento indutivo*" e o dispositivo que garante o acoplamento é chamado de matching box [26].

Antes da aplicação da fonte de energia externa, os átomos estão normalmente em seu estado de energia mais baixo ou estado fundamental (E_0). A energia aplicada leva momentaneamente os átomos a um estado de energia mais alto ou estado excitado (E_1), onde o elétron mais externo é promovido para uma configuração menos estável, ocorrendo assim o processo de absorção. Após alguns nanossegundos, os átomos excitados relaxam para o estado fundamental, fornecendo suas energias como fótons de radiação. A transição para ou de um estado fundamental é denominada transição de ressonância e a linha espectral resultante é chamada linha de ressonância [27, 28].

Como o estado excitado é instável, após absorver a radiação a espécie retorna ao estado de energia mais estável, liberando a energia adquirida na forma de radiação eletromagnética (luz), com o comprimento de onda (λ) diretamente relacionado com a

transição eletrônica que ocorreu. A radiação emitida em cada comprimento de onda permite a determinação da concentração do elemento presente na amostra. O conjunto das radiações emitidas por uma espécie constitui os sinais de todas as radiações provocadas pelas transições de energia e apresenta um conjunto de comprimentos de onda denominado linhas de emissão [29].

A técnica de ICP OES é bastante utilizada por possuir boa sensibilidade e fazer medições precisas, proporcionando baixos limites de detecção [30]. Pode ainda ser utilizada para a determinação de mais de 40 elementos em uma ampla variedade de amostras. Vem sendo utilizada no Brasil desde a década de setenta, quando foram instalados os primeiros equipamentos de ICP OES. Desde então, modificações estão sendo propostas nos seus componentes ópticos e sistemas de detecção a fim de melhorar a sensibilidade e precisão dos resultados.

1.4. Digestão com ácido diluído

O preparo da amostra é uma das principais etapas em uma analise química. A escolha apropriada entre os vários reagentes e técnicas para a decomposição da amostra torna-se uma etapa crítica no sucesso de uma análise. Um dos conceitos da química verde consiste na utilização de poucos reagentes e consequentemente na mínima geração de resíduos tóxicos.

Uma das etapas de uma análise consiste em submeter a amostra a um tratamento adequado visando sua preparação para os passos subsequentes. A decomposição da amostra depende da sua natureza, do elemento a ser determinado e sua concentração, do método de análise, da precisão e exatidão desejada [31]. Uma das maneiras para diminuir o consumo de reagentes utilizados na digestão da amostra pode ser obtida empregando soluções de ácidos diluídos, uma vez que se minimizam os resíduos gerados, diminui-se a periculosidade e geram-se menores valores de brancos analíticos. Assim, a utilização de ácidos diluídos é uma alternativa à estratégia convencional que consiste na utilização de soluções de ácidos concentrados [32].

Procedimentos que utilizam pequenos volumes de ácido ou solução de ácidos diluídos necessitam da adição de um agente oxidante para aumentar o poder oxidante da mistura utilizada. O agente oxidante mais utilizado é o peróxido de hidrogênio

(H_2O_2), pois estudos comprovam a diminuição no teor de carbono residual, aumentando assim a eficiência da digestão das amostras quando comparado com outras misturas ácidas empregadas [33].

Araújo *et al*. [34] estudaram a eficiência da digestão ácida assistida por radiação microondas de tecidos vegetais empregando diferentes concentrações (2,0, 3,0, 5,0, 7,0 e 14 mol L^{-1}) de ácido nítrico (HNO_3). Os teores de carbono orgânico residual, acidez residual e a recuperação dos elementos nos materiais de referência certificados foram avaliados. A utilização de HNO_3 2,0 mol L^{-1} foi eficiente para a recuperação dos principais analitos e apresentou menor variedade de compostos orgânicos residuais comparando-se à solução de ácido nítrico concentrado que apresentou compostos orgânicos aromáticos e alifáticos, com os compostos alifáticos presentes em maiores concentrações do que os aromáticos, indicando a ocorrência do processo oxidativo convertendo moléculas complexas em moléculas simples. Assim, o ácido concentrado sob altas temperaturas tem um alto poder oxidante, por outro lado soluções de ácidos diluídos apresentam menor poder oxidante, mas com emprego de temperaturas elevadas exibem uma ação eficiente no processo de digestão.

Bizzi *et al*. [35] avaliaram a eficiência de digestão de amostras botânicas empregando solução de ácido nítrico diluído e pressurização com oxigênio nos frascos reacionais para a determinação de Al, Ca, Fe, K, Mg e Na em amostras de orégano. Quantidades aproximadas 0,5 g de amostras foram digeridas utilizando diferentes concentrações de ácido nítrico (2,0, 3,0, 7,0 e 14 mol L^{-1}) e pressurização com O_2 (5, 10, 15, 20 bar). Foram realizados experimentos sem a pressurização e, nesse caso, 3,0 mL de HNO_3 concentrado foi necessário para decompor as amostras de orégano. Soluções de ácido nítrico com concentração de até 3,0 mol L^{-1} e pressão de 5,0 bar de oxigênio foram eficientes para a digestão das mesmas amostras. A exatidão do procedimento foi avaliada usando materiais de referência certificado obtendo-se valores de recuperação de 95 e 104% para todos os analitos.

Neste trabalho, as amostras de diferentes espécies de maracujá foram digeridas em recipientes fechados, usando a combinação de ácido nítrico diluído e H_2O_2.

1.5 Técnicas de tratamento de dados

1.5.1 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) é um método de reconhecimento de padrão não supervisionado utilizado para projetar dados n dimensionais em um espaço de baixa dimensão, ou seja, as informações contidas no espaço de dimensão n são comprimidas através de combinações lineares das variáveis originais a um espaço geralmente de ordem 2 ou 3 [36]. A PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados. É também capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória. Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de “scores” e “loadings”, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados [37, 38].

1.5.2 Redes Neurais

As redes neurais artificiais são baseadas em modelos abstratos do funcionamento do cérebro humano e tentam reproduzir sistemas biologicamente realísticos. O objetivo da rede neural é estabelecer uma relação, linear ou não, entre um conjunto de dados de entrada e uma correspondente saída ou resposta. Para isto são utilizadas transformações matemáticas na entrada, de modo a produzir a saída desejada. A rede realiza este trabalho “aprendendo” como o sistema em estudo se comporta, e então, aplica este conhecimento a novos dados de entrada para predizer a saída apropriada [39].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para determinação de micro e macronutrientes em diferentes espécies de maracujá produzidas na região Sudoeste da Bahia utilizando ácido nítrico diluído e detecção por ICP OES.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar e validar um método de digestão utilizando ácido nítrico diluído que permita a extração de micro e macro nutrientes presentes em amostras de maracujá.
- Otimizar parâmetros instrumentais do ICP OES (potência de radiofrequência do plasma, vazão do gás de nebulização, vazão do gás auxiliar, vazão do gás do plasma) utilizando otimização univariada.
- Aplicar a metodologia desenvolvida na determinação de Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn em amostras de duas espécies de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora cincinnata*).
- Avaliar a composição de diferentes partes do fruto (polpa, semente e casca) por meio de técnicas multivariadas, PCA e Redes neurais.
- Fornecer informações nutricionais sobre o maracujá produzido na região sudoeste da Bahia.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Especificações dos equipamentos e materiais

- Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, PERKIN ELMER, modelo Optima 7000 ICP (Configuração Dual View);
- Balança analítica SARTORIUS, modelo BL D105;
- Balança semi-analítica GEHAKA, modelo BK 200;
- Triturador CADENCE, modelo PRATIC blender;
- Refrigerador CONSUL, modelo CRA28888NA;
- Estufa marca EUROBRÁS;
- Bomba de abertura/digestão, modelo PARR 4749;
- Micropipetas (Transferpette Digital - BRAND, RB704174, RB704178; Sealpette, ER 33832; Kacil S); ponteiras (BRAND, 18170, 18266, 702533);
- Vidraria convencional, mantida em solução de HNO_3 a 10 % (v/v) por mais de 24 h para descontaminação. Antes do uso, toda a vidraria foi enxaguada com água ultrapura.

3.2. Instrumentação

Os parâmetros estabelecidos para o trabalho estão listados na Tabela 4, os quais foram otimizados ou utilizados conforme recomendações do fabricante.

Tabela 4. Condições de operação do espectrômetro de emissão optico com plasma indutivamente acoplado.

Parâmetros	Condição
Potência de RF (W)	1000 – 1500
Vista	Axial
Gerador de RF	40,00 MHz
Nebulizador	Fluxo cruzado (*Cross Flow*)
Câmara de nebulização	Duplo passo (Tipo Scott)
Detector	Estado Sólido (CCD)
Vazão de argônio do plasma	11 - 15 L min^{-1}
Vazão de nebulização	0,5 - 1,0 L min^{-1}
Vazão de argônio auxiliar	0,5 - 1,0 L min^{-1}
Vazão de amostragem	1,50 mL min^{-1}

Os elementos estudados e suas respectivas linhas analíticas estão apresentados na Tabela 5. Essas linhas de emissão foram escolhidas de acordo com a literatura ou por sugestão do fabricante do instrumento.

Tabela 5. Elementos estudados e suas respectivas linhas analíticas**.**

Linha do elemento	Comprimento de onda (nm)	Linha do elemento	Comprimento de onda (nm)
Ca II	317,933	Na I	589,592
Co II	228,616	Mg I	285,213
Cu I	324,752	Mn II	257,610
Fe II	238,204	Zn I	213,857
K I	766,490		

I – Linha atômica; II – Linha iônica

3.3 Preparo de soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico. Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura, obtida de um sistema de purificação Mili-Q, com resistência específica de 18 MΩ cm e reagentes de grau analítico.

3.3.1 Soluções de ácido nítrico

As soluções foram preparadas medindo-se quantidades apropriadas do ácido P.A. (FMAIA) e diluindo-se com água ultrapura.

3.3.2 Solução multielementar de Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn para estudo dos parâmetros instrumentais

Aferiu-se em micropipetas quantidades apropriadas de solução de trabalho multielementar 1000 mg L^{-1} (FLUKA) contendo os elementos citados acima e diluiu-se para 100 mL com água ultrapura em meio de HNO_3 a 5 % (v/v).

3.4 Otimização dos parâmetros de operação do ICP OES

A intensidade de uma linha de emissão em ICP OES depende do número de átomos ou íons emitindo sob as condições experimentais usadas. Os principais parâmetros possíveis de ajustar são: a potência incidente fornecida pela fonte de RF, as vazões dos gases na tocha, a pressão do gás de nebulização e o local de observação do plasma para efetuar as medidas espectroscópicas. Estes parâmetros são interdependentes, e ao mudar um deles os demais também são afetados [24].

Neste trabalho foi utilizado o método univariado, onde se varia um parâmetro de cada vez, mantendo-se os outros constantes, a fim de otimizar alguns parâmetros instrumentais do equipamento (ICP OES). Os sinais foram medidos como valores de intensidade de emissão, entretanto como cada elemento emite radiação com magnitude diferente foi necessário apresentar uma maneira de trabalhar simultaneamente com todas as respostas em uma mesma escala para facilitar a apresentação e interpretação dos resultados, por isso foi feito a normalização dos dados [40]. A normalização é feita dividindo-se os valores das intensidades individuais de cada elemento pelo maior valor obtido nas intensidades. Todos os resultados devem estar compreendidos entre 0 e 1.

3.5 Coleta das amostras

As amostras de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e maracujá verde (*Passiflora cincinnata)* foram coletadas diretamente em plantações dos municípios de Itiruçú, Jaguaquara, Jequié, Lafaiete Coutinho e Maracás, localizados no sudoeste da Bahia. A Figura 5 ilustra um mapa geográfico da região sudoeste da Bahia, com os municípios de coleta destacados em vermelho [41]. Os frutos foram armazenados em refrigerador até o procedimento da digestão.

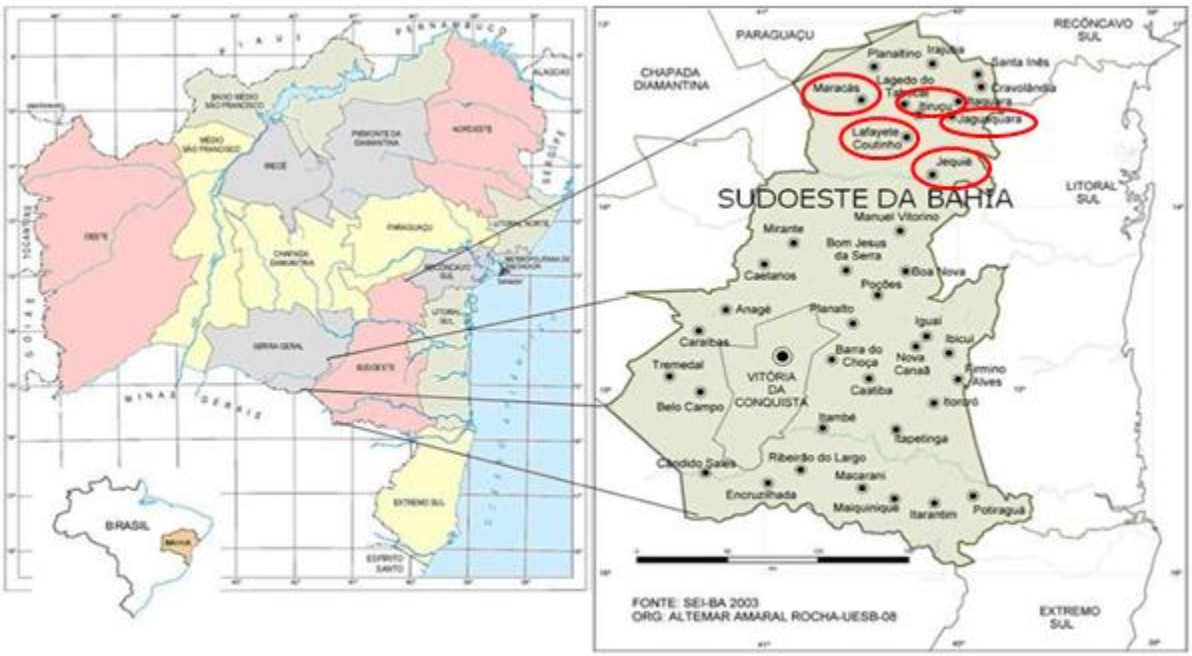

Figura 5. Imagem ilustrativa do mapa geográfico da região sudoeste da Bahia.

3.6 Otimização do procedimento de digestão

Inicialmente foi feito um estudo para otimizar a digestão das amostras (casca, semente e polpa) das duas espécies de maracujá com quatro combinações de concentrações de ácido nítrico usando um volume de ácido nítrico de 2,0 mL e tempo de aquecimento em estufa (4,0 mol/L por 3 horas; 4,0 mol/L por 4 horas; 7,0 mol/L por 3 horas e 7,0 mol/L por 4 horas) + 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 30%, utilizando sistema de decomposição sob pressão, em um recipiente de politetrafluoreliteno (PTFE), contido em um cilindro de aço, a uma temperatura de 160 ºC.

3.6.1 Digestão das amostras

Inicialmente o fruto foi separado em três partes: polpa; casca e semente. Em seguida a casca e semente foram secas por um período de aproximadamente 12 horas em estufa, a 80 ºC. Após este processo foram trituradas e armazenadas em recipientes devidamente lacrados para posterior digestão. A digestão da polpa foi realizada no ato da separação das partes do fruto, sem necessidade do processo de secagem. Aproximadamente 0,2000 g da polpa e 0,1000 g da semente e da casca foram pesadas

para posterior digestão em frascos fechados. As amostras foram misturadas em 2,0 mL de solução de ácido nítrico (4,0 mol L^{-1}) e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi colocada em bombas de digestão e levada à estufa, onde foi mantida por 4 horas a uma temperatura em torno de 160 ºC. Após resfriamento do sistema em questão as soluções finais foram conservadas em geladeira até o momento da análise. No momento de leitura no ICP OES as soluções foram transferidas para balões de 10 mL e avolumadas com água ultrapura.

3.7 Tratamento dos dados

O tratamento estatístico dos dados das amostras foi realizado e fundamentado na técnica multivariada conhecida como análise de componentes principais (PCA) e redes neurais. Foram utilizados os softwares Excel® (para cálculo dos parâmetros estatísticos básicos), Statistica® 7.0 (para as análises multivariadas de dados - PCA) e Matlab (para a avaliação por redes neurais).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização dos parâmetros instrumentais

Neste trabalho, os parâmetros instrumentais foram otimizados buscando-se, a princípio, obter uma condição ideal através da investigação da potência de radiofrequência e das vazões dos gases de nebulização, auxiliar e do argônio do plasma. Estes parâmetros foram otimizados mediante o uso da vista de observação axial do plasma. O ajuste desses parâmetros instrumentais depende da natureza da linha a ser detectada, ou seja, das energias requeridas para ionização e excitação das espécies.

4.1.1 Estudo da potência de radiofrequência

A potência de radiofrequência é uma variável que está relacionada diretamente com a energia do plasma. Neste trabalho, o desempenho do plasma foi avaliado variando-se a potência de 1000 a 1500 W, mantendo-se os outros parâmetros constantes. Esses valores em estudo foram escolhidos em virtude de o plasma permanecer estável e não se extinguir durante a análise [42]. Os resultados obtidos para os elementos Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn estão apresentados na Figura 6.

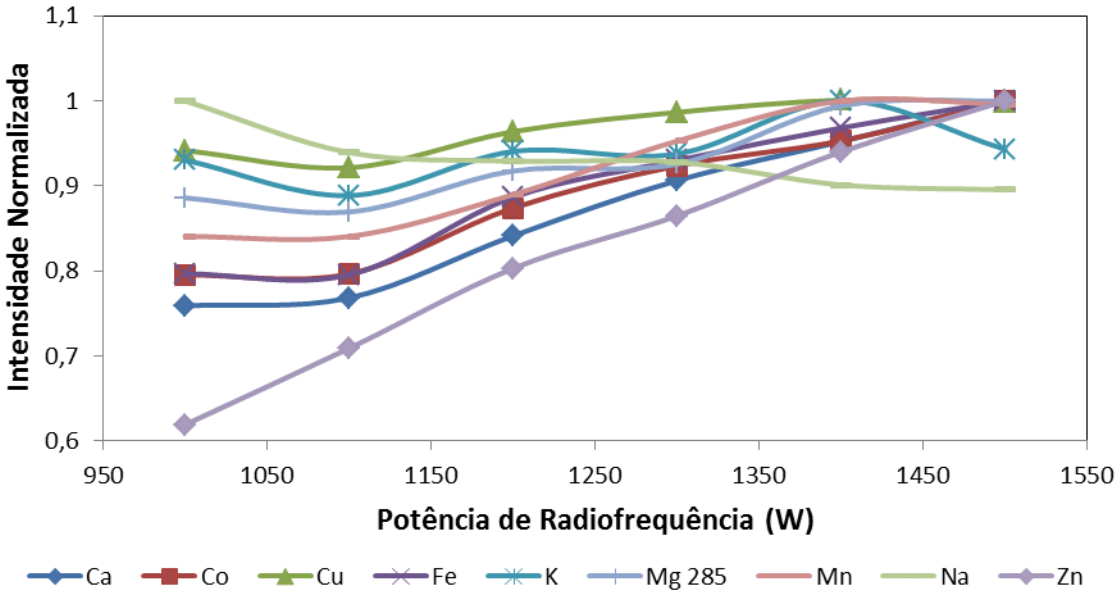

Figura 6. Estudo da potência de RF aplicada ao ICP OES**.**

É possível perceber que com o aumento da potência há uma tendência no aumento da intensidade de emissão para os elementos analisados, isto significa que os processos de excitação e ionização são melhorados pelo aumento da potência. Este comportamento permite um aumento da sensibilidade para os elementos em estudo, exceto para o potássio e sódio, que sofreram um pequeno decréscimo de intensidade para valores de potência acima de 1400 W.

Para a escolha da melhor potência utilizada deve-se levar em consideração algumas informações adicionais e não somente a tendência mostrada nos experimentos, pois o uso de potências elevadas pode aumentar o nível de ruído e também o sinal de fundo, afetando a determinação de microconstituintes [43]. Deve ser levado em consideração também que elevados valores de potência implica em desgastes de componentes do instrumento [44], assim como a redução da vida útil da tocha e outros acessórios do equipamento. Por isso foi escolhido para estudos posteriores o valor de 1.300 W.

4.1.2 Estudo da vazão de fluxo de nebulização

A vazão de nebulização está associada com a formação do aerossol e o tempo de residência do analito. O principal requisito da vazão de fluxo de nebulização é que o gás atinja altas velocidades para que, na expansão, provoque uma queda considerável de pressão e o líquido seja aspirado, além de transportar, por arraste, o aerossol da amostra até o centro do plasma [24]. Para avaliar o comportamento da intensidade de emissão dos elementos em função dos diferentes valores da vazão de fluxo de nebulização aplicada fez-se um estudo da vazão de 0,5 a 1,0 L/min, mantendo-se os outros parâmetros constantes. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.

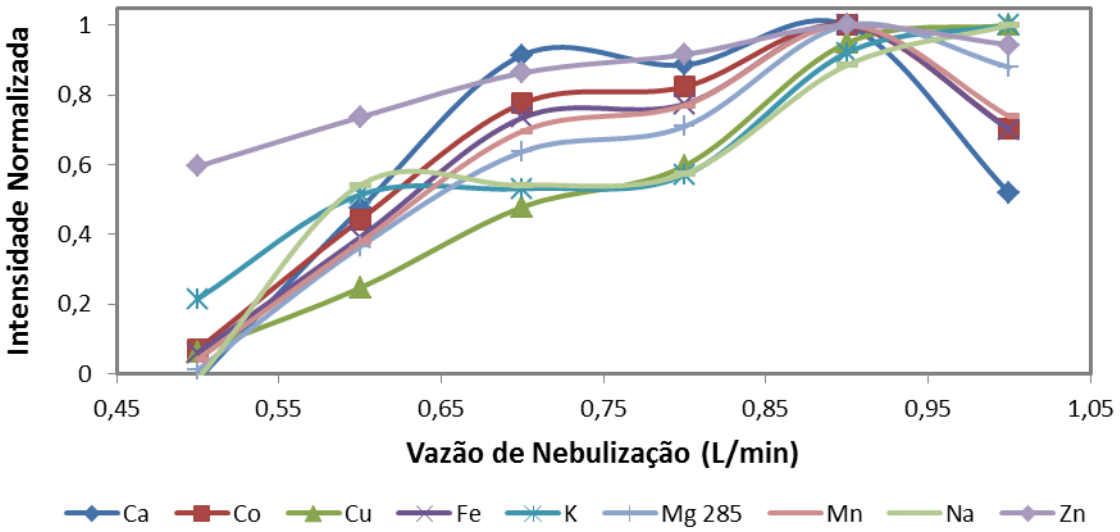

Figura 7. Estudo da vazão de fluxo de nebulização aplicada ao ICP OES.

A partir deste estudo pode-se observar que ocorre uma tendência de aumento na intensidade de emissão em função do aumento do fluxo de nebulização para os todos os elementos avaliados, no entanto, observa-se que para vazões acima de 0,9 L/min há um decréscimo na intensidade de emissão para a maioria dos elementos. Esse comportamento para baixas vazões pode ser explicado em virtude de o tempo de residência do analito aumentar, aumentando também o fenômeno de auto-absorção, com consequente redução do sinal analítico [45]. No entanto, se a vazão de nebulização é muito alta, o tempo de residência do analito diminui, assim como a eficiência dos processos que ocorrem no plasma. Além disso, com vazões maiores ocorre o resfriamento do plasma, reduzindo a quantidade de átomos e espécies ionizadas [46]. Assim, uma condição com vazão de nebulização intermediária promove a formação de um aerossol com pequenas gotículas, que favorecem o processo de dessolvatação e, consequentemente, resulta em melhor atomização, excitação e ionização. A vazão de nebulização escolhida para os estudos posteriores foi 0,8 L/min.

4.1.3 Estudo da vazão do gás auxiliar

O gás auxiliar tem por função dar um formato adequado ao plasma mantendo-o isolado na tocha, evitando assim que a mesma sofra processo de fusão [43]. A vazão do gás auxiliar é importante na manutenção da robustez do plasma, principalmente frente à amostra com alto teor de matéria orgânica. Para avaliar o comportamento da

intensidade de emissão em função dos diferentes valores da vazão do gás auxiliar aplicada fez-se um estudo de 0,5 a 1,0 L/min, mantendo-se os outros parâmetros constantes. Os resultados obtidos para os elementos estão apresentados na Figura 8.

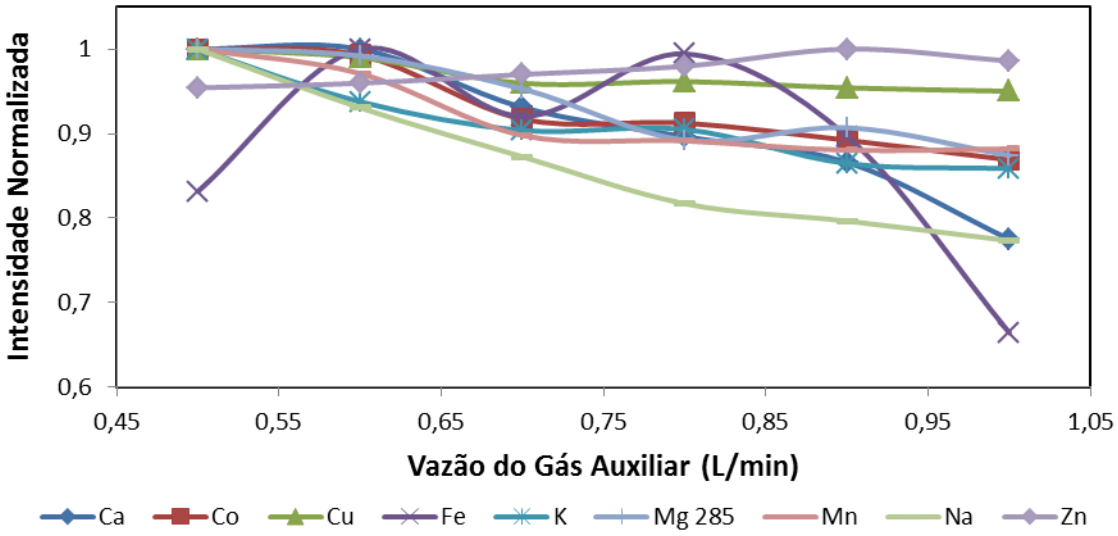

Figura 8. Estudo da vazão do gás auxiliar aplicada ao ICP OES.

A partir do estudo realizado pode-se observar que a intensidade de emissão das espécies estudadas aumentou com o aumento do fluxo do gás auxiliar. No entanto, para valores acima de 0,8 L/min ocorre um decréscimo na intensidade. Fez-se a escolha para os estudos posteriores o valor de 0,7 L/min.

4.1.4 Estudo da vazão do gás do plasma

O estudo da vazão do gás do plasma é outro parâmetro importante, pois ele provoca o isolamento térmico externo da tocha que resfria as paredes internas do tubo central e centraliza o plasma, sendo esta vazão também responsável pela sustentação do mesmo. Neste experimento foi feito um estudo com vazões do argônio de 11 a 15 L/min. Os resultados obtidos para os elementos estudados estão apresentados na Figura 9.

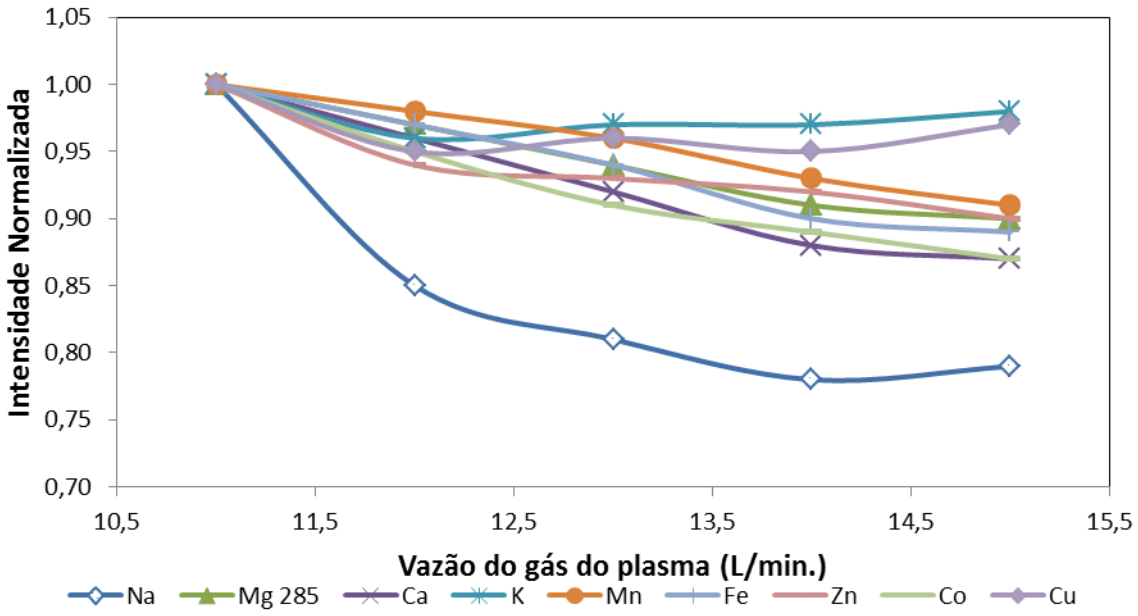

Figura 9. Estudo da vazão do gás do plasma aplicado ao ICP OES.

Analisando a Figura 9 observa-se que com o aumento da vazão do gás do plasma, há um ligeiro decréscimo nas intensidades dos elementos, com exceção do K. O decréscimo observado para o sódio foi maior em relação aos demais elementos, isto pode ter sido causado por ele ser um elemento facilmente ionizável, e a presença desse elemento no plasma pode ter uma intensificação ou redução na intensidade do sinal do analito. O comportamento para os demais elementos pode ser dependente das condições de operação do espectrômetro, como a potência aplicada. Assim, uma vazão considerada adequada é 12 L/min, sendo a escolhida para os próximos estudos. Entretanto vazões maiores podem ser utilizadas para alguns elementos, sem comprometer o sinal analítico.

As melhores condições encontradas na otimização dos parâmetros instrumentais (potência de RF, vazão de fluxo de nebulização, vazão do gás auxiliar, vazão de argônio do plasma) do ICP OES estão resumidas na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros otimizados para o ICP OES.

Parâmetros	Valores
Potência (W)	1.300
Vazão de fluxo de nebulização (L/min)	0,80
Vazão do gás auxiliar (L/min)	0,70
Vazão de argônio do plasma (L/min)	12,0

4.2 Digestão com ácido diluído

A determinação de metais em alimentos exige um passo anterior à determinação dos analitos. A utilização de frascos fechados são utilizados atualmente, a fim de melhorar a eficiência na oxidação e também reduzir o tempo de digestão. A digestão em vaso fechado apresenta muitas vantagens. Uma temperatura e pressão elevada permite uma melhor e mais rápida digestão da amostra; espécies voláteis não são evaporadas, elas ficam retidas na solução; a liberação de vapores tóxicos no ar do laboratório é evitada; pequenos volumes de ácidos podem ser usados e a mistura é isolada do ar reduzindo assim a contaminação pelo ar [47]. A realização de reações usando elevada temperatura e pressão pode permitir uma redução da concentração do ácido, sem diminuir a eficiência da digestão. A viabilidade da utilização de soluções diluídas contendo concentrações mais baixas de ácido nítrico tem sido demonstrada experimentalmente [48, 49]. A utilização de atmosfera de oxigênio, juntamente com ácido nítrico diluído leva a uma regeneração de ácido nítrico e uma melhoria em relação a eficiência da digestão de amostras [50].

O uso de ácido nítrico diluído sem afetar a eficiência da digestão depende de dois fatores. O primeiro está relacionado com a presença de oxigênio na fase gasosa dentro do vaso fechado e o segundo fator envolve o gradiente de temperatura entre a fase liquida e gasosa. A primeira é responsável pela reação de oxidação na fase gasosa, a segunda contribui menos no aumento da pressão uma vez que esta está associada com a absorção das espécies oxidadas na fase gasosa. A absorção é melhorada com a ocorrência de um gradiente de temperatura e a soma de ambos os fatores implica em um ciclo de reações de regeneração do ácido nítrico como mostra as reações a seguir.

$$(CH_2)_n + 2\ HNO_{3(aq)} \rightarrow CO_{2(g)} + 2\ NO_{(g)} + 2\ H_2O_{(l)} \quad (1)$$

$$2\ NO_{(g)} + O_{2(g)} \rightarrow 2\ NO_{2(g)} \quad (2)$$

$$2\ NO_{2(g)} + H_2O_{(l)} \rightarrow HNO_{3(aq)} + HNO_{2(aq)} \quad (3)$$

$$HNO_{2(aq)} \rightarrow H_2O)_{(l)} + NO_{2(g)} + NO_{(g)} \quad (4)$$

Em (1) a presença da matéria orgânica e a oxidação por ácido nítrico resulta na formação de $NO_{(g)}$. Em (2) a presença de oxigênio na fase gasosa promove a oxidação do $NO_{(g)}$ em $NO_{2(g)}$. Depois a reação de desprotonação ocorre e $NO_{2(g)}$ é convertido em NO_3^- e NO_2^-, assim o ácido nítrico formado será reiniciado em um novo ciclo [51]. A utilização de uma solução de ácido nítrico diluído combinado com peróxido de hidrogênio é uma estratégia verde que pode ser implementada sem diminuir a eficiência da digestão.

Neste trabalho foi realizado a otimização das condições de digestão das amostras de maracujás usando ácido nítrico diluído, peróxido de hidrogênio e tempo de digestão. A condição escolhida para a digestão das amostras foi definida em 4,0 mol/L ácido nítrico e 4 horas de aquecimento na estufa a 160 ºC, como a condição ideal para digestão deste tipo de matriz. Levando-se em consideração que a melhor digestão deve conduzir a uma decomposição completa da amostra usando a menor quantidade de reagentes possíveis. Com isso, essa condição gerou menos resíduo do que com o uso de ácidos concentrados, além de tornar o método menos dispendioso, mantendo ainda a eficiência no processo de digestão.

4.3 Figuras de mérito

Para a determinação de Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn nas amostras de polpa, semente e casca das duas espécies de maracujá por ICP OES pelo método proposto foram consideradas as seguintes figuras de mérito: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

4.3.1 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em uma dada faixa de concentração [52]. Pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos

ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear (Equação 1).

$$Y = ax + b \qquad \text{Equação (1)}$$

Onde:

Y = resposta medida;

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração

b = interseção com o eixo y

A avaliação da linearidade pode ser feita através do coeficiente de correlação linear (R) ou do coeficiente de determinação (R^2). Um R^2 próximo da unidade revela que o método possui uma boa linearidade na faixa de concentração estudada. Valores de R^2 maiores que 0,99 indicam boa linearidade.

As equações da regressão linear para os resultados encontrados a partir das curvas analíticas de cada elemento estão apresentadas na Tabela 7. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,9937, o que implica boa linearidade das curvas.

Tabela 7. Coeficientes de determinação e faixa dinâmica linear obtida a partir do método desenvolvido por ICP OES.

Elem.	**Equação**	**R^2**	**Linearidade**
Ca	Y = (228981,8 ± 2480,0)*Conc + (21981,5 ± 27747,0)	0,9995	0 – 25 mg/L
Co	Y = (189819,6 ± 1709,1)*Conc - (22999,5 ± 17703,7)	0,9996	0 – 25 mg/L
Cu	Y = (842282,3 ± 8933,0)*Conc – (109788,7 ± 92531,1)	0,9994	0 – 25 mg/L
Fe	Y = (295228,7 ± 1707,1)*Conc – (20539,3 ± 17683,3)	0,9998	0 – 25 mg/L
K	Y = (323466,6 ± 12468,4)*Conc – (172406,8 ± 139500,7)	0,9940	0 – 25 mg/L
Mg	Y = (2,32676x10^6 ± 32077,8)*Conc – (436317,1 ± 332272,9)	0,9990	0 – 25 mg/L
Mn	Y = (1,00369x10^6 ± 35641,5)*Conc + (394028,7 ± 369187,0)	0,9937	0 – 50 mg/L
Na	Y = (273107,5 ± 1636,2)*Conc – (6031,3 ± 35261,6)	0,9999	0 – 25 mg/L
Zn	Y = (228981,8 ± 2480,0)*Conc + (21981,5 ± 27747,0)	0,9995	0 – 50 mg/L

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

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas [53]. A estimativa do limite de detecção pode

ser feita com base na relação de três vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente aos brancos dividido pelo coeficiente angular da curva, como mostra a equação (2).

$$LD = \frac{3 \times s}{a} \qquad \text{Equação (2)}$$

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas [53]. O limite de quantificação pode ser calculado de forma semelhante ao limite de detecção, sendo dez vezes o desvio padrão do branco dividido pela inclinação da curva (equação 3).

$$LQ = \frac{10 \times s}{a} \qquad \text{Equação (3)}$$

Sendo assim, a Tabela 8 apresenta os respectivos LD e LQ para o método proposto. Todos os limites atende a necessidade de realizar as análises, visto que as concentrações dos analitos nos frutos de maracujá são bem superiores aos limites calculados.

Tabela 8. Limites de detecção e quantificação dos elementos determinados por ICP OES.

Elementos	LD (µg/g)	LQ (µg/g)
Ca	13,0	43,0
Co	0,4	1,3
Cu	3,0	10,0
Fe	3,0	10,0
K	6,0	20,0
Mg	8,0	26,6
Mn	0,1	0,33
Na	17,0	56,6
Zn	3,0	10,0

4.3.3 Teste de exatidão (validação)

A validação de um método é um processo essencial para definir se o mesmo está adequado aos objetivos a que se destina, fornecendo resultados confiáveis. Através de estudos experimentais, pode-se assegurar que o método desenvolvido

atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados [54, 55].

Para a validação do método proposto foi realizado um teste de recuperação dos analitos fazendo adições de 0,50 e 1,00 mg/L, em triplicata, antes do procedimento de digestão. A Tabela 9 apresenta as médias das triplicatas das percentagens de recuperação dos analitos nas duas concentrações.

Tabela 9. Recuperações obtidas para os elementos analisados.

Elementos	Adicionado (mg/L)		Encontrado (mg/L)		Recuperação (%)	
Ca	0,50	1,00	0,61	1,12	122	112
Co	0,50	1,00	0,47	0,97	94	97
Cu	0,50	1,00	0,49	0,98	98	98
Fe	0,50	1,00	0,57	1,21	114	121
K	0,50	1,00	0,46	0,90	92	90
Mg	0,50	1,00	0,47	0,95	94	95
Mn	0,50	1,00	0,47	0,95	94	95
Na	0,50	1,00	0,50	1,00	99	100
Zn	0,50	1,00	0,48	0,98	96	98

A recuperação dos elementos utilizando o método proposto está compreendida entre 92 e 122 %. O estudo de recuperação demonstrou ser adequado, com resultados dentro da faixa de aceitação de 80 a 120% [56], com as únicas exceções para cálcio e ferro, que apresentaram recuperações de 122 e 121 %, respectivamente.

4.4 Análise das amostras de maracujá

Após otimização das variáveis em estudo e do processo de digestão das amostras foi feita a quantificação de Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn na polpa, casca e semente dos frutos dos maracujás por ICP OES. Os resultados, representados como média e intervalo de confiança para três replicatas, estão apresentados nas Tabelas 10 e 11. A Figura 10 apresenta os dados de concentração para cada elemento comparando a amostra de maracujá amarelo (MA) e maracujá verde (MV). A partir desses dados fez-se a aplicação da análise de componentes principais e redes neurais.

Tabela 10. Concentrações (µg/g) dos elementos estudados nas amostras de polpa, semente e casca do maracujá-amarelo.

	Amostra / Cidade														
	Polpa (P)					Semente (S)					Casca (C)				
Conc. (µg/g)	**Ma**	**Je**	**Ja**	**La**	**It**	**Ma**	**Je**	**Ja**	**La**	**It**	**Ma**	**Je**	**Ja**	**La**	**It**
Ca	1477,5 ± 617	1240,0 ± 294,6	824,7 ± 240,1	223,8 ± 83,3	371,4 ± 300,4	307,3 ± 56,8	510,5 ± 163,5	3799,2 ± 126,0	271,6 ± 49,7	566,4 ± 27,5	6590,9 ± 376,1	4979,6 ± 250,0	2567,5 ± 93,9	2694,7 ± 91,2	2671,7 ± 151,5
Co	26,7 ± 1,16	26,2 ± 1,94	26,5 ± 1,15	25,7 ± 1,95	25,7 ± 1,43	12,7 ± 0,61	13,0 ± 0,74	12,7 ± 0,19	12,5 ± 0,50	12,9 ± 0,30	12,6 ± 0,13	13,3 ± 1,07	12,5 ± 0,19	12,5 ± 0,24	12,5 ± 0,22
Cu	67,8 ± 45,7	35,8 ± 7,31	32,7 ± 4,92	34,1 ± 5,30	39,0 ± 16,5	23,5 ± 5,37	26,8 ± 2,56	24,0 ± 3,11	31,7 ± 3,25	35,1 ± 7,91	55,1 ± 10,8	28,3 ± 50,1	24,6 ± 9,21	31,2 ± 35,1	17,5 ± 1,10
Fe	38,7 ± 26,9	31,8 ± 12,6	36,0 ± 5,51	62,8 ± 49,6	39,8 ± 16,8	64,1 ± 10,9	74,6 ± 12,9	302,4 ± 174,4	79,6 ± 19,7	180,7 ± 115,2	58,4 ± 11,8	48,9 ± 4,69	75,0 ± 44,4	86,5 ± 5,2	83,6 ± 19,2
K	24443,4 ± 2049,8	18185,4 ± 2461,4	22267,5 ± 4935,9	15734,0 ± 2162,4	17555,1 ± 905,4	5793,3 ± 1083,4	5539,4 ± 953,4	10061,7 ± 856,4	5862,6 ± 1196,3	8924,7 ± 357,5	5988,5 ± 584,5	42951,4 ± 9281,4	5527,6 ± 292,1	65291,9 ± 26311,0	2845,6 ± 66,0
Mg	849,1 ± 71,0	865,8 ± 164,7	864,6 ± 49,6	608,5 ± 112,6	971,5 ± 115,3	1463,8 ± 241,8	1478,4 ± 285,0	2359,3 ± 559,9	2054,1 ± 474,2	2512,4 ± 274,7	2015,2 ± 79,4	889,4 ± 37,5	1427,3 ± 23,4	1155,7 ± 45,5	1404,1 ± 159,7
Mn	49,2 ± 3,73	55,7 ± 5,87	53,6 ± 2,03	48,5 ± 3,27	53,6 ± 3,68	34,4 ± 2,01	41,3 ± 3,22	41,1 ± 5,12	38,0 ± 1,51	44,2 ± 1,13	31,3 ± 1,38	102,1 ± 5,21	36,4 ± 0,95	27,8 ± 0,60	44,2 ± 0,07
Na	723,7 ± 96	731,4 ± 62,6	763,0 ± 49,7	773,9 ± 88,9	788,4 ± 173,9	280,2 ± 8,05	367,1 ± 107	404,0 ± 81,9	357,9 ± 25,9	462,5 ± 51,4	1397,2 ± 410	1430,2 ± 174,1	1582,7 ± 108	6249,0 ± 331	3213,2 ± 315
Zn	65,0 ± 11,4	51,8 ± 28,6	34,8 ± 2,36	21,2 ± 2,63	30,1 ± 11,6	61,9 ± 6,02	54,6 ± 5,02	82,7 ± 27,8	65,2 ± 5,22	80,4 ± 19,8	89,6 ± 9,3	44,1 ± 2,29	21,9 ± 2,84	27,9 ± 3,18	23,8 ± 2,32

Ma – Maracás; Je – Jequié; Já – Jaguaquara; La - Lafeiete Coutinho; It – Itiruçu.

Tabela 11. Concentrações (µg/g) dos elementos estudados nas amostras de polpa, semente e casca do maracujá-verde.

	Amostra / Cidade														
	Polpa (P)					**Semente (S)**					**Casca (C)**				
Conc. (µg/g)	**Ma**	**Je**	**Ja**	**La**	**It**	**Ma**	**Je**	**Ja**	**La**	**It**	**Ma**	**Je**	**Ja**	**La**	**It**
Ca	983,3 ± 104,4	610,7 ± 202,2	684,8 ± 186,4	366,8 ± 69,6	719,7 ± 138,4	740,9 ± 118,9	949,7 ± 265,6	827,8 ± 369,2	561,5 ± 73,7	439,2 ± 88,5	5362,7 ± 879,0	8660,6 ± 2520,6	3038,2 ± 351,5	4200,6 ± 689,2	3988,3 ± 323,2
Co	26,6 ± 3,20	25,7 ± 1,05	25,9 ± 1,40	26,1 ± 0,43	25,4 ± 1,0	12,5 ± 0,90	13,1 ± 1,55	13,0 ± 0,96	12,8 ± 1,22	12,8 ± 0,63	12,5 ± 0,30	12,7 ± 0,54	12,7 ± 0,21	12,6 ± 0,49	12,3 ± 0,61
Cu	38,7 ± 23,2	58,9 ± 27,9	36,0 ± 14,6	61,8 ± 26,1	36,7 ± 9,22	32,9 ± 2,35	29,7 ± 20,4	28,1 ± 3,72	29,7 ± 13,5	30,8 ± 6,55	18,2 ± 1,29	16,4 ± 5,93	19,4 ± 1,81	16,6 ± 2,25	22,7 ± 3,71
Fe	36,3 ± 6,35	27,6 ± 4,96	26,3 ± 5,91	27,2 ± 9,11	34,2 ± 10,3	86,5 ± 78	31,8 ± 14,6	44,0 ± 30,2	36,7 ± 4,85	51,7 ± 24,0	54,8 ± 19,9	36,9 ± 6,31	61,8 ± 6,10	42,1 ± 7,09	54,4 ± 9,7
K	31868,0 ± 4197,8	27188,7 ± 5173,6	30277,9 ± 8426,9	20947,6 ±6106,3	28328,3 ± 9546,7	10358,8 ± 1597,5	7971,1 ± 3381,8	9395,4 ± 7086,5	4834,1 ± 756,4	5690,4 ± 1358,2	4474,2 ± 341,9	3601,3 ± 685,6	3415,8 ± 399,0	4309,3 ± 918,0	4601,2 ± 309,4
Mg	1105,4 ± 213,4	1124,8 ± 125,8	884,9 ± 216,6	667,0 ± 155,6	1039,2 ± 262,3	1977,0 ± 623,0	1719,7 ± 1000,0	1792,0 ± 1666,3	1583,2 ± 385,7	1526,8 ± 580,7	1832,0 ± 74,9	2662,0 ± 688,0	1141,1 ± 64,1	1048,8 ± 108,7	1181,7 ± 34,3
Mn	77,0 ± 2,51	52,0 ± 0,80	55,7 ± 4,94	56,1 ± 4,92	51,1 ± 3,6	47,2 ± 4,5	37,1 ± 6,64	37,0 ± 3,61	42,6 ± 3,47	31,9 ± 3,24	142,7 ± 14,9	47,6 ± 5,96	63,5 ± 2,78	88,8 ± 3,80	36,2 ± 0,99
Na	597,4 ± 15,6	645,9 ± 47,2	631,5 ± 163,9	526,6 ± 185,5	553,1 ± 65,7	334,4 ± 21,1	352,4 ± 62,7	318,1 ± 59,5	247,1 ± 62,5	258,0 ± 16,9	444,7 ± 82,3	453,6 ± 79,3	419,1 ± 7,27	476,3 ± 49,1	441,3 ± 74,5
Zn	32,4 ± 12,2	44,3 ± 8,09	19,3 ± 11,6	23,0 ± 19,5	16,8 ± 6,48	76,6 ± 20,8	30,8 ± 16,7	37,7 ± 20,3	37,1 ± 4,69	39,2 ± 18,6	38,4 ± 3,90	17,3 ± 3,75	16,7 ± 2,50	24,8 ± 2,50	7,32 ± 1,70

Ma – Maracás; Je – Jequié; Já – Jaguaquara; La - Lafeiete Coutinho; It – Itiruçu.

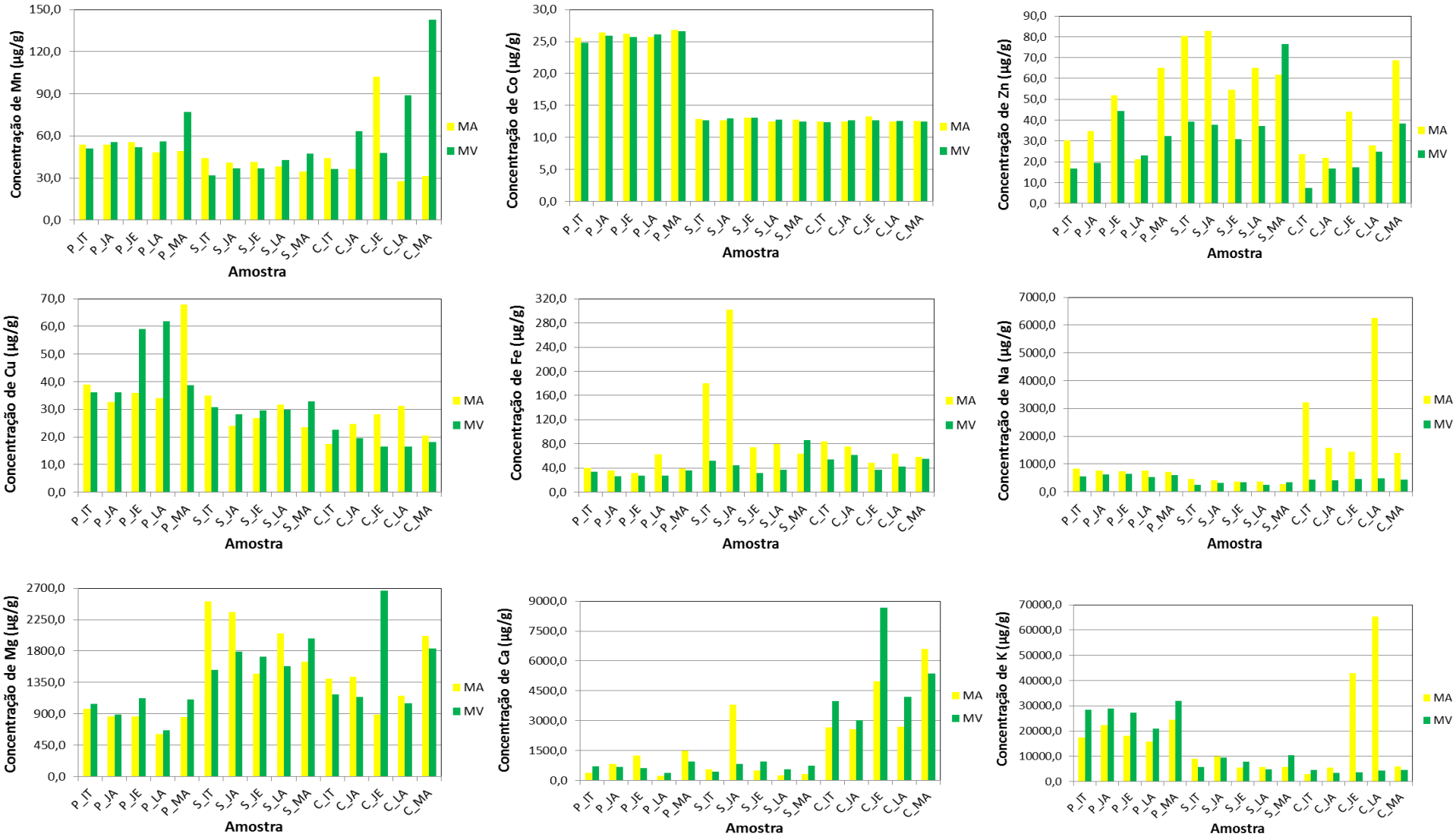

Figura 10. Gráficos de comparação de concentração para o maracujá-amarelo e maracujá-verde.

Nesta análise considerou-se três partes que compõe o fruto (polpa, semente e casca). Nota-se, que em todas as partes analisadas do fruto as maiores concentrações de Fe, Na e Zn foram obtidas para o maracujá amarelo e para o maracujá-verde apenas o Mn foi encontrado em maior concentração. O K esteve presente em maior concentração na casca do maracujá-amarelo e na polpa do maracujá-verde. Os elementos Ca, Co, Cu e Mg estiveram presentes em concentrações equivalentes em ambos frutos.

Maiores médias de concentrações foram obtidas principalmente para os elementos Ca e K. Isto pode ser explicado pelo fato de que os solos da região são ricos em minerais e pelo uso de fertilizantes ricos em nutrientes que os produtores fazem desde o momento do plantio até a colheita. Dentre os fertilizantes mais usados na lavoura encontra-se o NPK (Nitrogênio, Fosforo e Potássio) e calcário, que é aplicado em diferentes fases da planta. Baixos teores de Na foram encontrados nas amostras. O maracujá verde é uma planta nativa, não sendo explorada comercialmente pelos agricultores, é bastante resistente à seca e pragas, não exigindo o uso de fertilizantes, entretanto é um fruto que apresenta altas concentrações de potássio.

Deve-se levar em consideração aos resultados que a casca e semente do maracujá passaram pelo processo de secagem em estufa, eliminando assim o máximo teor de água, enquanto que a polpa foi digerida sem a etapa de secagem. O teor de água encontrado na casca variou entre 70 e 90 % e na semente variou de 40 a 50 %. Sendo assim a comparação da concentração das diferentes partes do fruto não pode ser feita apenas pela análise rigorosa dos dados.

4.5 Tratamento dos dados usando análise de componentes principais

A avaliação dos resultados obtidos após a determinação dos analitos por ICP OES (Tabelas 10 e 11) foi realizada empregando a análise por componentes principais. Devido à grande quantidade de dados originais obtidos (45 amostras x 9 variáveis = 405 análises, para cada espécie) é interessante realizar esse tratamento matemático para tornar a compreensão e interpretação dos dados mais fácil.

A primeira etapa constituiu na montagem de uma matriz de dados contendo as informações referentes às amostras de maracujá dispostas em linhas e as

informações referentes às variáveis (valores individuais de concentração dos elementos) dispostas em colunas.

O número de PCs que podem ser obtidas é exatamente igual ao número de variáveis disponíveis. Neste trabalho, têm-se nove variáveis originais (os elementos Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn) e, portanto, pode-se obter nove PCs. No entanto, torna-se vantajoso se usar as PCs porque, ao contrário das variáveis originais, a maior parte das informações está contida nas primeiras PCs e as restantes podem ser descartadas contribuindo para a redução da dimensionalidade dos dados. Isto não pode ser feito com as variáveis originais. Há diversos critérios para se selecionar o número de PCs necessárias para descrição do comportamento dos dados: (a) a percentagem de variância explicada, (b) a magnitude do autovalor e (c) a inflexão do gráfico screen-plot [57].

Nas Tabelas 12 e 13 estão apresentados os valores associados às correlações entre as variáveis (os metais estudados) e as cinco primeiras componentes principais. Considerou-se como de contribuição significativa a variável com valor de correlação acima de 0,6.

Tabela 12. Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do maracujá-amarelo.

	PC1	**PC2**	**PC3**
Ca	0,306633	0,516486	- 0,589924
Co	**- 0,750096**	- 0,506363	0,079321
Cu	- 0,521759	- 0,471097	0,264808
Fe	**0,776549**	- 0,068345	0,062713
K	- 0,369880	**0,707365**	0,215614
Mg	**0,962414**	- 0,035765	0,150646
Mn	- 0,378397	- 0,150283	**- 0,805770**
Na	- 0,210158	**0,922693**	0,228173
Zn	**0,685296**	- 0,434575	0,011199

Nota-se na Tabela 12 que os dados provenientes da determinação de Ca e Cu não apresentam tanta significância na modelagem dos dados. As variáveis que mais contribuem na variância total (Co, Fe, Mg e Zn) apresentaram valores significantes na PC1, ressaltando que essa primeira componente principal representa 36,13% da variância dos dados, sendo os elementos Co, Fe, Mg e Zn os

maiores valores de peso na PC1. A segunda componente principal (PC2) é responsável por 25,71% dos dados, sendo K e Na os elementos que apresentaram maior valor na PC. A terceira componente principal (PC3) é responsável por 13,32 % da variância dos dados referente a variável Mn. Já as PCs 4 e 5 não apresentaram valores significativos para nenhuma variável.

Tabela 13. Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do maracujá-verde.

	PC1	PC2	PC3
Ca	0,554780	**0,742412**	- 0,081544
Co	**- 0,973174**	0,052447	- 0,116125
Cu	**- 0,821302**	- 0,402334	- 0,037391
Fe	**0,656812**	- 0,340149	- 0,409148
K	**- 0,928011**	- 0,058847	- 0,175561
Mg	**0,751236**	- 0,057436	- 0,054239
Mn	0,066080	0,526437	**- 0,760239**
Na	**- 0,771141**	0,479519	- 0,268352
Zn	0,191422	**- 0,754005**	- 0,567458

Na Tabela 13, referente ao maracujá verde, nota-se que três componentes principais descrevem a variância dos dados. As variáveis que apresentaram maior contribuição na PC1 foram (Co, Cu, Fe, K, Mg e Na) com 49,13% da variância dos dados. A segunda componente principal (PC2) representa 21,27% da variância para as variáveis Ca e Zn. A terceira componente principal (PC3) representa 13,27% da variância dos dados para o Mn.

O critério da inflexão do gráfico do screen-plot também foi aplicado. Este gráfico relaciona o número de PCs com seu autovalor. Este critério baseia-se no fenômeno descrito pelo surgimento de uma inflexão no gráfico quando se atinge PCs relacionadas às variâncias residuais [58, 59]. No screen plot apresentado na Figura 11 observa-se que a inflexão ocorre na terceira PC. Então, de acordo com este critério, deve se escolher três PCs para explicar a variância dos dados. As três PCs juntas referente ao maracujá-amarelo (Figura 10a) explicam 75,16 % da variação

dos dados. Já na Figura 10b referente ao maracujá verde as três PCs explicam 83,67 % dos dados.

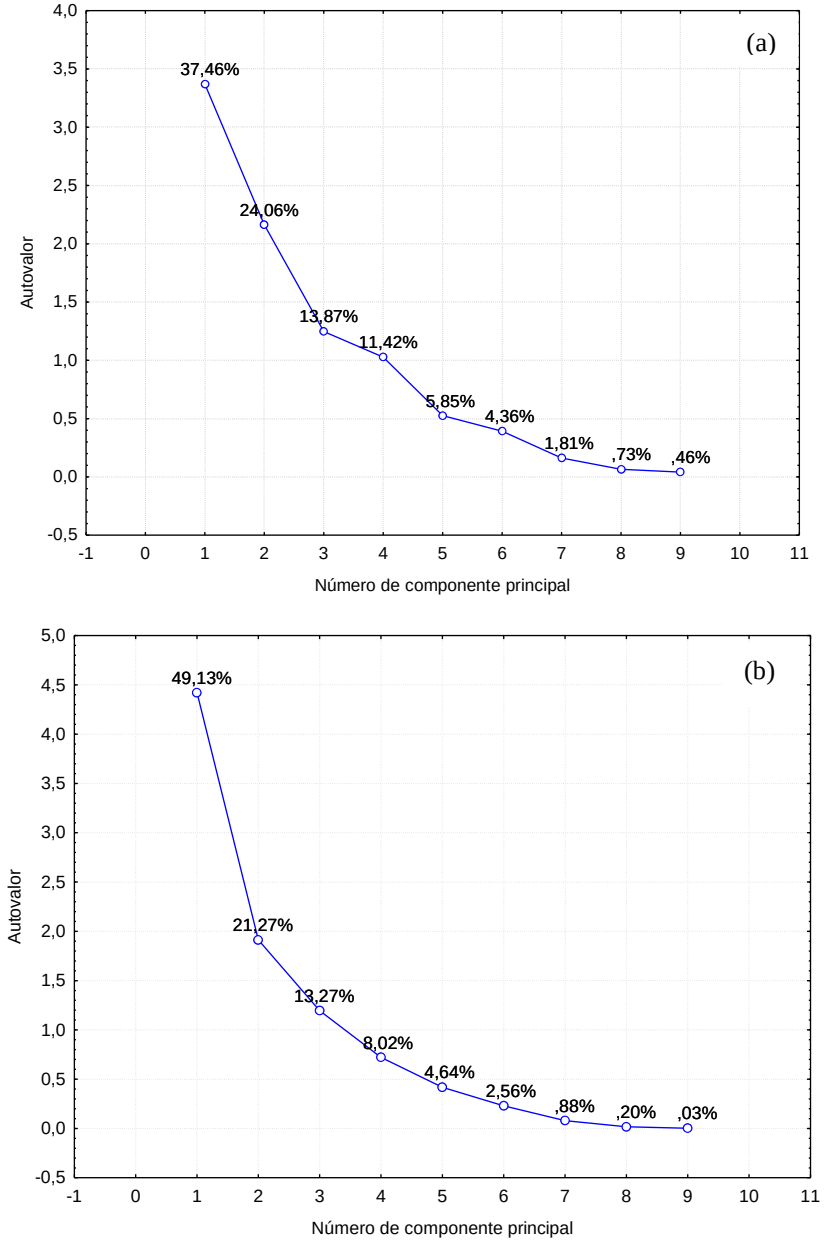

Figura 11. Screen-plot para os dados provenientes da análise elementar das amostras de (a) maracujá-amarelo e (b) maracujá verde.

O PCA é uma forma de identificar e expressar dados destacando suas similaridades e diferenças, assim a interpretação dos resultados de uma análise de componentes principais é usualmente realizada pela visualização de gráficos de escores e de loadings. A Figura 12 (a) e (b) apresentam os gráficos dos escores com as PCs mais significativas (PC1 e PC2) para os dados das Tabelas 5 e 6.

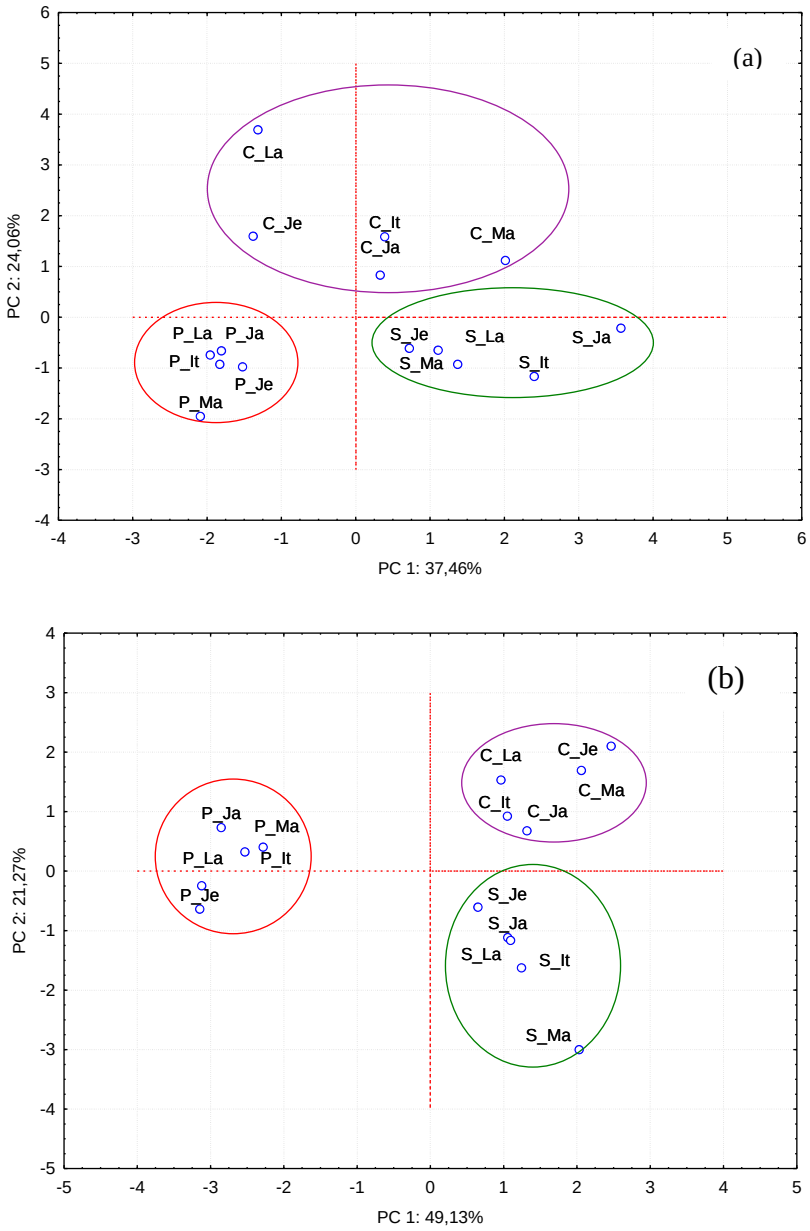

Figura 12. Gráficos dos escores PC1 versus PC2 para as amostras de maracujá-amarelo (a) e maracujá verde (b).

De acordo com a Figura 11 (a) e (b) pode-se inferir que a análise de PCA conseguiu agrupar as amostras de polpa, semente e casca das duas espécies de maracujás investigadas, existindo assim uma clara separação entre os grupos. A projeção dos loadings sobre as PCs gera o gráfico dos loadings que é apresentado na Figura 13. Este gráfico permite a avaliação da contribuição de cada variável na separação dos grupos. A correlação entre as variáveis é descrita pelo cosseno do ângulo entre os vetores loadings. Quanto menor for o ângulo entre estes vetores,

maior será a correlação entre as variáveis. Variáveis não correlacionadas apresentam ângulo entre os seus vetores próximos de 180º [58, 59].

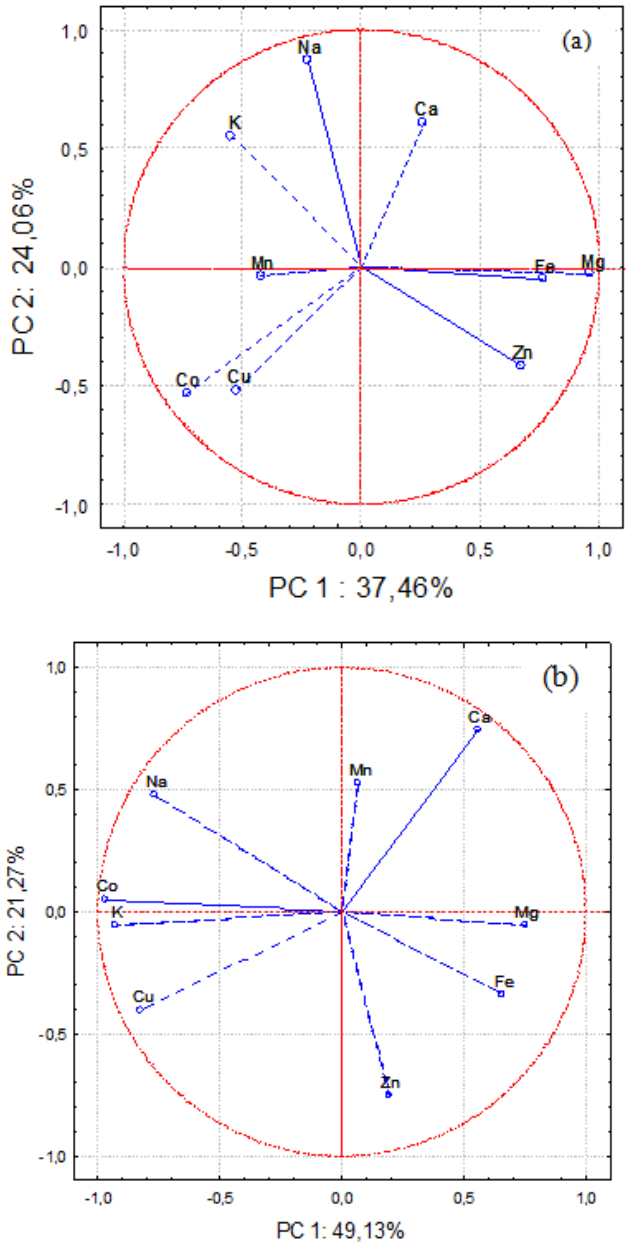

Figura 13. Gráfico dos loadings para PC1 e PC2 para (a) maracujá-amarelo e (b) maracujá verde.

Analisando a Figura 13a, observa-se a formação de três grupos de variáveis responsáveis pelo agrupamento das amostras. O primeiro formado pelas variáveis K e Na, o segundo formado por Mn, Co e Cu e outro formado pelas variáveis Mg, Fe e Zn. Já na Figura 13b não houve uma perfeita separação entre os grupos, no entanto consegue-se agrupar variáveis quando projetadas para uma única PC. Um fator

importante também a ser observado é o tamanho do vetor loading em relação à PC considerada. O tamanho deste vetor indica a importância de uma determinada variável na modelagem da PC. Loadings muito próximos da origem do sistema cartesiano (pequeno tamanho) representam variáveis com pouca importância na descrição do comportamento dos dados [54].

4.6 Tratamento dos dados usando análise por redes neurais artificiais

Uma rede neural de Kohonen [60] com grades hexagonais foi obtida após análise multivariada com os dados das Tabelas 10 e 11. O arranjo com 30 neurônios apresentou a melhor distribuição das amostras. Após a análise foi possível observar a formação de três grupos diferentes, como mostra a Figura 14. Os grupos formados usando redes neurais foram muito similares aos encontrados através de PCA.

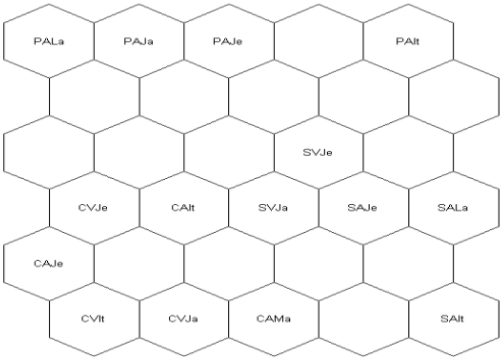

Figura 14. Mapa de grupos de amostras (polpa, semente e casca) obtido por redes neurais de Kohonen.

As amostras localizadas em neurônios vizinhos apresentam características semelhantes. O mapa das variáveis estudadas é apresentado na Figura 15, onde as barras ao lado indicam a intensidade de cada variável estudada. As cores avermelhadas significam valores mais elevados.

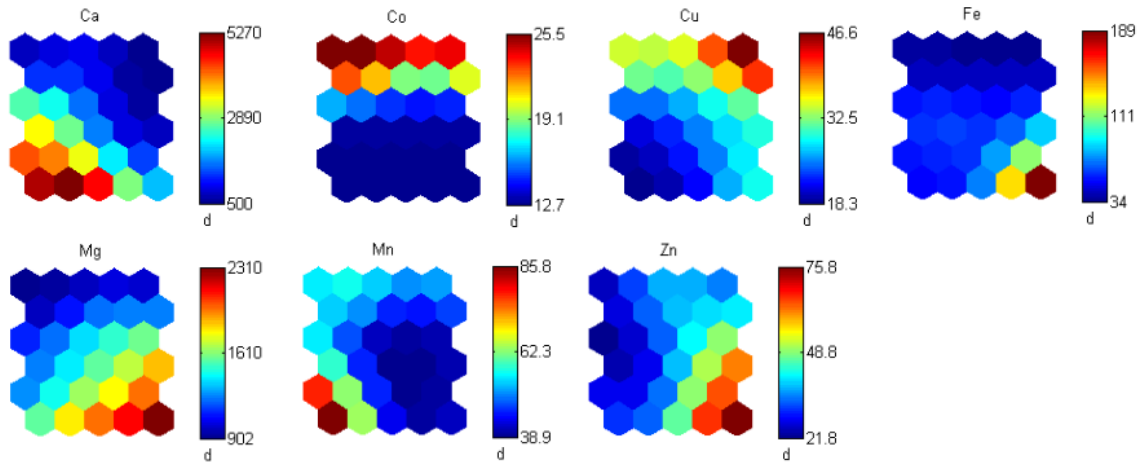

Figura 15. Mapa de distribuição das variáveis individuais obtidas pela rede neural de Kohonen.

Os elementos Na e K não aparecem no mapa devido às elevadas concentrações dos mesmos. Analisando a Figura 15, observa-se concentrações elevadas de Ca e Mn nas cascas, já Mg, Fe e Zn apresentaram elevadas concentrações na semente. Nas polpas do maracujá amarelo foram encontradas as maiores concentrações de Co e Cu.

5 CONCLUSÃO

O procedimento de digestão de amostra com ácido nítrico diluído permitiu uma extração eficiente dos elementos estudados, tornando-se mais econômico durante as análises do que com o uso de ácidos concentrados. O método não utiliza grandes quantidades de reagentes, contribuindo assim para a redução de resíduos no laboratório.

A otimização dos parâmetros do ICP OES foi importante para avaliar o desempenho dos processos que ocorrem no plasma, estabelecendo condições ideais para a realização das análises.

O procedimento proposto apresentou limite de detecção, limite de quantificação e linearidade adequados para a determinação de Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn nas amostras. A exatidão pôde ser comprovada através da análise de amostras fortificadas com diferentes concentrações dos elementos. Com essas figuras de mérito estabelecidas fez-se a determinação dos analitos na casca, semente e polpa dos frutos de maracujá.

A análise de componentes principais e redes neurais mostrou-se eficaz para a observação de diferentes grupos nos gráficos (polpa, semente e casca), demostrando que há uma diferença clara na composição química entre as partes do fruto estudadas.

As amostras de maracujá coletadas nos municípios de Itiruçú, Jaguaquara, Jequié, Lafaiete Coutinho e Maracás estão fornecendo nutrientes em quantidades adequadas.

6 PERSPECTIVAS

A avaliação da robustez do plasma através dos parâmetros: vazão do gás do plasma, vazão de nebulização, vazão do gás auxiliar e potência de radiofrequência, poderá ser realizada afim de alcançar melhores condições nas análises.

Pesquisas podem ser realizadas para obter informações sobre as características do solo onde é cultivado o maracujá e ver a influência deste na composição do fruto.

Outros elementos poderão ser analisados, como metais potencialmente tóxicos, para verificar se há absorção pela planta e fixação no fruto uma vez que os produtores fazem o uso de fertilizantes e agrotóxicos para o controle de pragas na planta.

Devido à grande variedade de espécies de maracujá existentes poderão ser realizados estudos de outras espécies que também são nativas da região e comparar com as duas espécies analisadas no trabalho. Ainda podem ser realizados estudos sazonais para verificar a influência de períodos chuvosos e de seca na absorção de nutrientes pela planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FOOD INGREDIENTES BRASIL, **Dossiê: os minerais na alimentação**, nº8, 2008. Disponível em: www.revista-fi.com.

[2] BELITZ, H.D.; GRROSCH, W. **Quimica de los Alimentos.** Alemanha: Acriba, 2a ed., 1992.

[3] JAIN, N.; JAIN, R.; SURENDRA, J. A review on: Abelmoschus esculentus, **Pharmacia**, vol.1 , ISSN 0976-9692, 2012.

[4] ROSS, A. B.; SAVAGE G. P.; MARTIN, R. J.; VANHANEN, L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol.47, p.5019-5022, 1999.

[5] GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D.A.T. **Food composition data: Production, Management and Use**, Rome: FAO, 2 ed, 2003.

[6] OTONI, B.S. et al. **Avaliações Químicas de Frutos de Quiabo em Diferentes Fases de Crescimento, em Janaúba, Norte de Minas Gerais.** Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, Minas Gerais, 2005.

[7] HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, vol.52, p.481-504, 2000.

[8] MAIA, S.M.P.C. **Aplicação da farinha do maracujá no processamento do bolo de milho e aveia para fins especiais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

[9] Disponível em: http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/maracuja/maracuja-6.php. Visualizado em 22/09/2014.

[10] EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do maracujá-do-mato é tema do Prosa Rural,** 2007. Disponível em < http://hotsites.sct.embrapa.br/prosarural/programacao /2007/cultivo-de-maracujá-do-mato >. Visualizado em 08 de Julho de 2014.

[11] ZERAIK, M.L.; PEREIRA,C.A.M.; ZUIN,V.G.;YARIWAKE, J.H. Maracujá: Um alimento funcional?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 20 (3): 459-471, 2010.

[12] Disponível em: http://www.cerratinga.org.br/maracujadacaatinga/. Visualizado em 22/09/2014.

[13] SEAGRI - Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Cultura – Maracujá.** Disponível em < http://www.seagri.ba.gov.br/Maracuja.htm#top > Acesso em 08 de Julho de 2014.

[14] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. **Produção agrícola municipal.** Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pom/2007/comentário.pdf. Acesso em 15 de Julho 2014.

[15] GONDIM, J. A. M. et al. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Rev. Bras. Frutic**., Jaboticabal - SP, vol. 32, n. 4, p. 1206-1210, Dezembro, 2010.

[16] PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, H. Y.; Constituintes e Farmacologia do Gênero *Passiflora* com Ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis Sims* e *P. incarnata L.* Artigo de Revisão/Review. **Rv. Bras. Pl. Med**., Botucatu, vol. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.

[17] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção a Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia Alimentar para a população brasileira:** promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministerio da Saúde, 2006.

[18] MARKERT, B. **Distribution and Biogeochemistry of Inorganic Chemicals in the Environment.** International: SCHUURMANN, G. and MARKERT, B. (eds.). Ecotoxicology. John Wiley ans Sons. Inc and Spektrum Akademischer Verlag. Part 2. Chapter 6, p. 165-199. 1998.

[19] FILHA, M. M. S; MATOS, R. P; LEITE**,** H. A; Determinação dos elementos traços Cd, Pb, Cu, Zn, Cr, Ni e Al em amostras de pães e vegetais comercializadas na

cidade de Jequié, Ba. **Revista Científica do Departamento de Química e Exatas**, Jequié-Bahia, vol 3 nº 1 março, 2012 p. 12-20.

[20] KITTS, D. D. **Metal contamination of food-its significance for food quality and human health**. 3rd.Edition; Conor Reilly. Blackwell Science Publishing, Oxford, 2003.

[21] LIMA, D. M.; COLUGNATI, F. A. B.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SALAY, E; GALEAZZI, M. A. M. **Tabela brasileira de composição de alimentos.** Versão II. 2. ed. -- Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 113 p, 2006.

[22] HINNEBURG, I; DAMIEN, H. J; RAIMO H. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, London, vol. 97, n. 1, p. 122-129, 2006.

[23] SANTOS, I.F.; **Determinação e Avaliação Quimiometrica da Composição Mineral do *Abelmoschus Esculentus L* Comercializados na Cidade de Salvador.** Dissertação de mestrado Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

[24] OLIVEIRA, E. **Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-AES).** Universidade de São Paulo, Laboratório de Espectrometria de Emissão Atômica (apostila), 1996.

[25] EBDON, L.; EVANS, E, H.; FISHER, A, S.; HILL, S, J. **An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry**.

[26[GINÉ, M. F. ***Espectrometria de Emissão Atômica Plasma Indutivamente Acoplado ICP-AES***. Piracicaba-SP: CENA, 1998.

[27] DEAN, J. R. **Pratical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy**. Wiley, 2005.

[28] SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. Ed. São Paulo: Gengage Leraning, 2006.

[29] GINÉ, M. F.; **Espectrometria de Emissão Atômica Plasma Indutivamente Acoplado ICP-AES**. Piracicaba-SP: CENA, 1998.

[30] Santos, J,S.; Teixeira, L, S, G.; Santos, W, N, L.; Lemos, V, A.; Godoy, J, M.; Ferreira, S, L, C Uranium determination using atomic spectrometric techniques: An overview. **Analytica Chimica Acta** Vol 674, Issue 2, 3 August 2010, Pages 143–156.

[31] KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostra. Fundamentos sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar**. 6ª ed. Abril, 2006.

[32] ARRUDA, M.A.Z., **Trends in Sample Preparation**. Nova Science Publishers, New York, 2007.

[33] WU, S. L., FENG, X.B., WITTMEIER, A. Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hidrigen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled mass spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom**;. 12: 797, 1997.

[34] ARAÚJO, G. |C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J. A.; Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Espectochimica acta parte B**, vol. 57, p. 2121 – 2132, 2002.

[35] BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MULLER, E. I.; SCHMIDT, L.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, vol. 83, p. 1324 – 1328, 2011.

[36] FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, R. A. Exploratory analysis of inorganic constitution contents in grape juices and soft drinks. **Ecletica Química**. 2002, 27, 77.

[37] PANERO, F. S.; SILVA, H. E. B. Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil. **Microchem. J**. 2008, 88, 194.

[38] CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova** 2007, 30, 481.

[39] SENA, M. M; POPPI, R. J;FRIGHETTO, R. T. S; VALARINI, P. J. **Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos. Embrapa Meio Ambiente,** Jaguariúna, SP, 1999.

[40] FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, H. S.; SILVA, E. G. P.; ARAÚJO, R. G. O.; AMORIM, F. A. C.; SOUZA, A. S.; MACEDO, S. M.; LIMA, D. C.; JESUS, R. M. BOSQUE-SENDRA, J. M. Application of Multivariate Techniques in Optimization of Spectroanalytical Methods. **Appllied Spectroscopy Reviews** 42: 475-491, 2007.

[41] http://tayronefelix.blogspot.com.br/2009/01/mapa-regiao-sudoeste-da-bahia.html.

[42] SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. Application of Box–Behnken design in the optimization of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. ***Spectrochimica Acta Part B*** 60, 737–742, 2005.

[43] PETRY, C. F. **Determinação de elementos traço em amostras ambientais por ICP OES.** Dissertação de mestrado. Porto Alegre, 2005.

[44] VIEIRA, E. C. **Avaliação de potencialidades e aplicações de espectrômetros com plasma acoplado indutivamente em análises químicas**. Tese de doutorado, São Carlos-SP, 2007.

[45] FROES, R. E. S.; SILVA, N. O. C.; NAVEIRA, R. L. P.; SILVA, J. C. J.; CIMINELLI, V. S. T.; WINDMOLLER, C. C.; SILVA, J. B. B. Determination of inorganic constituents in hemodialysiswater samplesusing inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially and radially viewed configurations. **Atomic Spectrometry** 28, 8–15, 2007.

[46] JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S. **Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, 1st ed., Black & Son Ltd., London, 1992.

[47] SZEFER, P. NIRAGU, J.O. **Mineral Components in Food**. Pg. 8. 2007.

[48] ARAÚJO, G.C.L. GONZALEZ, M.H. FERREIRA, A.GA. NOGUEIRA, R.A. NÓBREGA J.A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials**. Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 2121–2132.**

[49] CASTRO, J.T., SANTOS, E.C., SANTOS, W.P.C., COSTA, L.M., KORN, M., NÓBREGA, J.A., KORN, M.G. A., 2009. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta (Oxford) 78, 1378-1382.**

[50] BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLOTO, R. S.; BARIN, J. S.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods, v. 2, p. 734-738, 2010.**

[51] FLORES, E.M.M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. Elsevier, Pg.181,

[52] INMETRO DOQ-CGCRE-008: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, 2003.

[53] SKOOG, DOUGLAS A., HOLLER, F. JAMES, NIEMAN, TIMOTHY A. **Princípios de Análise Instrumental.** Bookman, 5ª Edição. 2002.

[54] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatocráficos e eletroforéticos. **Química Nova**, vol. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

[55] PRICHARD, E.; MACKAY, G. M. Trace Analysis: A structured approach to obtaining reliable results. **The Royal Society of Chemistry**, 1996.

[56] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioq**. *Univ. São Paulo,* São Paulo, vol.30, p.49-53, 1994.

[57] OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry.** Wiley, 2nd edition, 2007.

[58] VICINI, Lorena. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. Monografia (especialização em Estatística e Modelagem Quantitativa) - Departamento de Estatística, Universidade Federal de Santa Maria UFSM, 2005.

[59] GODINHO, M. S.; PEREIRA, R. O.; RIBEIRO, K. O.; SCHIMIDT , F.; OLIVEIRA, A. E. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). **Química Nova**, Vol. 31, No. 6, 1485-1489, 2008.

[60] Gontijo, E S. J.; Oliveira F. S. D.; Fernandes , M. L.; Silva, G. A.; Roeser, H. M. P.; Friese, K. Application of a Multivariate Exploratory Analysis Technique in the Study of Dissolved Organic Matter and Metal Ions in Waters from the Eastern Quadrilátero Ferrífero, Brazil. ***J. Braz. Chem. Soc***., Vol. 25, No. 2, 208-218, 2014.