UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

JUSCELIA PEREIRA DOS SANTOS ALVES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COM BASE EM DISSOLUÇÃO ALCALINA COM HIDRÓXIDO DE TETRAMETILAMÔNIO (TMAH) PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM CARNE DE BODE COMERCIALIZADAS NA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA

JEQUIÉ - BAHIA
OUTUBRO DE 2019

JUSCELIA PEREIRA DOS SANTOS ALVES

Desenvolvimento de método com base em dissolução alcalina com Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH) para determinação de metais em carne de bode comercializadas 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 Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Brasil

JEQUIÉ - BA
OUTUBRO DE 2019

A474d Alves, Juscelia Pereira dos Santos.
Desenvolvimento de método com base em dissolução alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para determinação de metais em carne de bode comercializadas na região Sudoeste da Bahia / Juscelia Pereira dos Santos Alves.- Jequié, 2019.
94f.

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

1.Carne de bode 2.Metais 3.Solubilização alcalina 4.TMAH 5.Planejamento Doehlert 6.Espectrometria atômica I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 546.3

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

"Desenvolvimento de método com base em dissolução alcalina com Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH) para determinação de metais em carne de bode comercializadas na região Sudoeste da Bahia"

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Marcos de Almeida Bezerra

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra - Orientador

(UFBA, Salvador - BA, 2006)

Anderson Santos Souza

Prof. Dr. Anderson Santos Souza

(UFBA, Salvador - BA, 2008)

Prof. Dr. Marcelo Eça Rocha

(UFBA, Salvador - BA, 2016)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 04 / 10 / 2019

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por me proporcionar coragem para lutar pelos meus sonhos, força para superar as dificuldades, saúde, sabedoria e determinação para chegar até aqui.

À minha mãe que mesmo em meio a tantas dificuldades sempre me incentivou a lutar pelos os meus sonhos. A minha irmã Gilvane por me acolher e apoiar desde a graduação, sempre me incentivando, ajudando e cuidando de mim. Ao meu sobrinho José que muitas vezes me alegrou em momentos de tristezas, dificuldades e cansaços.

Agradeço ao meu esposo Claudio Alves, por todo amor, carinho, oração, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigada pela torcida, incentivo, ajuda, paciência, e por estar sempre comigo mesmo estando longe.

Ao professor Dr. Marcos de Almeida Bezerra, pela valorosa orientação, confiança, apoio, pelas oportunidades, paciência, competência e ensinamentos transmitidos. O senhor é um exemplo de pessoa e de profissional, sua humildade lhe torna cada dia maior. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio. Você sempre foi muito mais que um orientador: para mim será sempre mestre e amigo. Gratidão por tudo!

Aos membros da banca examinadora, Profº Dr. Anderson Santos Souza e Profº Dr. Marcelo Eça Rocha, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com este trabalho.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia por ter me proporcionado uma formação superior de qualidade e pela oportunidade da realização do meu curso de mestrado. A todos os funcionários da instituição pelos serviços prestados. Agradeço de forma especial aos funcionários da Coordenação de Laboratórios, por todo apoio, ajuda, amizade e disponibilidade, em especial a Solidade, Néia, Jurandir, Moisés, Gabriel, Conça, Naiara e Diogo.

Agradeço a Prof.ª Dr.ª Sulene Araújo pelo carinho, apoio e cuidado que sempre teve por mim, sou muito grata por todo incentivo, conselhos e pela amizade.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Química Analítica II, pela amizade, companhia, e por ter me proporcionado todo apoio e incentivo para efetivação desse trabalho, especialmente agradeço a Valdinei, Gisseli, Darci, Atanael e Hélio. Agradeço muito ao meu querido amigo Uillian pela inspiração, estímulo e risadas mesmo quando o cansaço parecia

me abater e, principalmente, pelas sugestões, conselhos, por ouvir meus desesperos e pelo carinho de sempre.

A todos os professores dos cursos de Química e do Programa de Pós Graduação em Química, muito obrigada por todos os ensinamentos, incentivos e amizade.

Ao LQA e LQA III pelo suporte, apoio e disponibilidade.

Um agradecimento ao Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria da UFBA, especialmente a Cheilane Tavares pela contribuição, colaboração e apoio.

A minha querida amiga Gilvania, amiga de todas as horas e conselheira. Agradeço também a todos os irmãos que Deus colocou em minha vida.

Agradeço a minha amiga Carla pelo incentivo, amizade e carinho de sempre. Às minhas amigas Izabela e Juciane, pelo carinho, pela força, companhia e amizade.

Aos colegas Nismax, Romário, Izabela e Valdinei por terem me ajudado na coleta das amostras de carnes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

A conclusão desta etapa exigiu muito esforço e disciplina que somente foi possível graças ao apoio, ajuda e compreensão de muitas pessoas. A todos que de alguma forma fizeram parte desta trajetória, deixo o meu sincero agradecimento e gratidão.

“Quando não souberes para onde ir, olha para trás e saiba pelo menos de onde vens”. (Provérbio africano).

Dedico este trabalho com muito carinho e gratidão

À minha mãe Gildete Pereira pelos ensinamentos de vida,

Ao meu esposo Claudio Alves pelo companheirismo e compreensão de sempre,

À minha irmã Gilvane Pereira e meu sobrinho José por toda ajuda, apoio e companhia.

O homem sem iniciativa, que tudo espera do acaso, é como o mendigo, que vive de esmolas. A mais bela coragem é a confiança que devemos ter na capacidade do nosso esforço. O que sobe por favor deixa sempre rastro de humilhação.

O caminho está aberto a todos, e se uns vencem e alcançam o que almejam, não é porque sejam predestinados, senão porque forçaram os obstáculos com arrojo e tenacidade.

Não há arrimo mais firme do que a vontade. O que se fia em si mesmo é como o que viaja com roteiro e provido de farnel e não perde tempo em informar-se do caminho nem em buscar estalagem para comer.

Aquele que confia em si anda sempre de olhos abertos; o que se entrega a outrem vai como cego: e tanto pode ser guiado para o bem como dirigido para o mal.

Só os fracos, os impotentes quedam na resignação; os enérgicos insurgem-se, lutam, dão combate à vida e vencem.

Henrique Coelho Neto

Desenvolvimento de método com base em dissolução alcalina com Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH) para determinação de metais em carne de bode comercializadas na região Sudoeste da Bahia

Autora: Juscelia Pereira dos Santos Alves

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

RESUMO: Este trabalho propõe uma comparação entre a solubilização alcalina usando Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH) e decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento usando HNO_3 concentrado para o preparo de amostras de carnes de bode visando a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e espectrometria de emissão atômica com chama (F AES). O método proposto neste trabalho foi otimizado avaliando o volume do hidróxido de tetrametilamônio, massa da amostra, tempo de sonicação do banho ultrassônico e temperatura usando planejamento Doehlert. Para a decomposição por via úmida em sistema aberto as condições selecionadas foram de 0,5g de amostra, 3 mL HNO_3, 2 mL de H_2O_2 em temperatura em torno de 120ºC por 120 minutos. Para a solubilização alcalina as condições ótimas encontradas foram de 0,5g de amostra, 15 minutos de sonicação no banho ultrassônico e 1000 µL de TMAH, e a temperatura foi fixada em 50 ºC. Os limites de detecção e quantificação obtidos para os analitos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn foram de, respectivamente, 2,28; 0,407; 1,24; 0,0752; 0,0665; 0,191; 0,169 µg g^{-1} e 7,60; 1,35; 4,14; 0,251; 0,221; 0,638; 0,563 µg g^{-1}. Os desvios padrão relativos variaram entre 0,093 a 5,2%. A exatidão foi avaliada comparando os resultados obtidos pela aplicação do método proposto com os resultados utilizando o bloco digestor. Foi avaliada também com o material de referência certificado, Bovine Liver NIST 1577b. A aplicação do teste t indicou que não houveram diferenças significativas em um nível de confiança de 95% entre os dois métodos avaliados.

Palavras-chaves: carne de bode, metais, solubilização alcalina, TMAH, planejamento Doehlert, espectrometria atômica

Development of method based on alkaline dissolution with Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH) for determination of goat meat metals commercialized in Southwest Bahia

Autora: Juscelia Pereira dos Santos Alves

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

ABSTRACT: This work proposes a comparison between alkaline solubilization using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and wet decomposition in the open system with heating using concentrated HNO_3 for the preparation of goat meat samples for the determination of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na and Zn and determination by flame atomic absorption spectrometry (F AAS) and flame atomic emission spectrometry (F AES). The method proposed in this work was optimized by evaluating tetramethylammonium hydroxide volume, sample mass, sonication time of ultrasonic bath and temperature using Doehlert design. For wet decomposition in open system the selected conditions were 0.5g of sample, 3 mL HNO_3, 2 mL of H_2O_2 at temperature around 120ºC for 120 minutes. For the alkaline solubilization the optimal conditions were 0.5g of the sample, 15 minutes of sonication in the ultrasonic bath, 1000 µL of TMAH and the temperature was set at 50 ºC. The detection and quantification limits obtained for the Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na and Zn analytes were, respectively, 2.28; 0.407; 1.24; 0.0752; 0.0665; 0.191; 0.169 µg g^{-1} and 7.60; 1.35; 4.14; 0.251; 0.221; 0.638; 0.563 µg g^{-1}. Relative standard deviations ranged from 0.093 to 5.2%. Accuracy was assessed by comparing the results obtained in the proposed method with the results using the digester block, was also evaluated with the certified reference material, Bovine Liver NIST 1577b. The application of the t-test indicated that there were no significant differences at a 95% confidence level between the two methods evaluated.

Keywords: Goat meat, metals, alkaline solubilization, TMAH, Doehelrt design, atomic spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efetivo do rebanho de caprinos no Brasil entre os anos de 2012 a 2017 5

Figura 2 – Fórmula estrutural do Hidróxido de Tetrametilamônio 16

Figura 3 – Esquema do procedimento geral para solubilização das amostras de carnes de bode 28

Figura 4 – Sistema de decomposição por via úmida em bloco digestor e "dedo frio" 29

Figura 5 – Equipamento ultrassônico utilizado para solubilização com TMAH 30

Figura 6 – Representação espacial de um cubo octaedro 33

Figura 7 – Representação gráfica plana para as três diferentes projeções do planejamento Doehlert: (a) face quadrada; (b) face triangular e (c) sob o vértice 33

Figura 8 – Gráficos de Pareto obtidos a partir dos dados do planejamento fatorial 2^4 mostrando os valores padronizados e a significância de cada variável 40

Figura 9 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados das variáveis massa da amostra e volume de TMAH 45

Figura 10 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados das variáveis tempo de sonicação e volume de TMAH 46

Figura 11 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados das variáveis tempo de sonicação e massa da amostra 47

Figura 12 – Perfis das desejabilidades individuais para Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn e perfil de desejabilidade global 50

Figura 13 – (a) Amostra após adição de água deionizada e TMAH antes da sonicação; (b) amostra após sonicação com TMAH 53

Figura 14 – Curvas analíticas obtidas em diferentes meios utilizando o artifício de equiparação da matriz 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de minerais (mg/100 g) em amostras de carnes de cabra e cabrito de acordo com a TBCA e USDA 14

Tabela 2 – Trabalhos descritos na literatura sobre o preparo de amostras com Hidróxido de Tetrametilamônio para determinação de metais 19

Tabela 3 – Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, e Zn 26

Tabela 4 – Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2^4 para a investigação prévia dos fatores que afetam a dissolução da amostra em TMAH assistida por energia de ultrassom 31

Tabela 5 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^4 para investigação dos fatores que afetam a dissolução da amostra em TMAH assistida por energia de ultrassom 32

Tabela 6 – Matriz de Doehlert para o planejamento experimental 34

Tabela 7 – Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn em amostra de carne de bode 38

Tabela 8 – Matriz do planejamento Doehlert para a otimização das variáveis que influenciaram no procedimento de solubilização da amostra de carne de bode 43

Tabela 9 – Análise de variância para o modelo quadrático ajustado à resposta combinada das absorvâncias e sinais de emissão dos sete metais estudados em nível de confiança de 95% ... 52

Tabela 10 – Parâmetros das curvas analíticas para o Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn obtidos nos meios aquoso, TMAH e adição padrão para as carnes analisadas 56

Tabela 11 – Linearidade das curvas analíticas 59

Tabela 12 – Limites de detecção, quantificação e desvio padrão relativo calculados para o método empregado 61

Tabela 13 – Recuperação (%) de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn em amostras de carnes de bode 62

Tabela 14 – Determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn em material de referência certificado tratado com TMAH e com digestão ácida 64

Tabela 15 – Comparação entre as concentrações dos analitos (mg g^{-1}) utilizando solubilização alcalina e decomposição por via úmida em bloco digestor 66

Tabela 16 – Aplicação do teste t pareado com 6 graus de liberdades para as amostras estudadas comparando os resultados da solubilização alcalina e decomposição por via úmida em sistema semi-aberto 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância, (do inglês: *Analysis of Variance*)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CRM	Material de referência certificado, (do inglês: *certified reference material*)
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, (do inglês: *flame atomic absorption spectrometry*)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, (do inglês: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, (do inglês *Graphite furnace atomic absorption spectrometry)*
HCL	Lâmpada de Cátodo Oco, (do inglês *Hollow Cathode Lamp*)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, (do inglês: *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)
IUPAC	União Internacinal de Química Pura e aplicada (do inglês*: International Union of Pure and Applied Chemistry*)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial de Saúde
RSD	Desvio Padrão Relativo, (do inglês: *Relative Standard Deviation*)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TBCA	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TMAH	Hidróxido de Tetrametilamônio, (do inglês: *Tetramethylammonium hydroxide*)

USDA Departamento Americano de Agricultura, (do inglês: *U.S. Department of Agriculture)*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **4**
2.1 A origem e raças de caprinos no Brasil **5**
2.2 Qualidade e aceitabilidade da carne caprina **6**
2.3 Características físico química da carne de bode: idade do abate **7**
2.4 Oligoelementos/metais essenciais: biodisponibilidade em alimentos **8**
2.5 Metais essenciais e a importância nutricional **9**
2.5.1 Cálcio 9
2.5.2 Ferro 9
2.5.3 Magnésio 10
2.5.4 Zinco 11
2.5.5 Cobre 12
2.5.6 Sódio 12
2.5.7 Potássio 13
2.5.8 Composição de nutrientes e minerais em amostras de carnes caprina de acordo com a TACO, TBCA e USDA 13
2.6 Uso de energia ultrassônica na química analítica no preparo de amostras **14**
2.7 Solubilização alcalina com Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH) **16**
3. OBJETIVOS **23**
3.1 Objetivo geral **24**
3.2 Objetivos específicos **24**
4. PARTE EXPERIMENTAL **25**
4.1 Equipamentos **26**
4.1.2 Materiais **26**
4.2 Reagentes **27**
4.3 Métodos **27**
4.3.1 Preparo das soluções de cálcio, cobre, ferro, magnésio, zinco, sódio e potássio 27
4.3.2 Pré-tratamento da amostra 27
4.3.3 Etapa prévia de hidratação da amostra 28

4.4 Decomposição por via úmida em sistema aberto com bloco digestor 29
4.5 Solubilização em meio alcalino utilizando energia de ultrassom 29
4.6 Otimização multivariada 30
4.6.1 Planejamento fatorial 2^4 31
4.6.2 Processo de otimização com o planejamento Doehlert 32
4.7 Avaliação da exatidão para o procedimento proposto 35
4.8 Análise estatística 35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
5.1 Otimização multivariada do método analítico proposto 37
5.1.2 Planejamento fatorial de dois níveis 37
5.1.3 Planejamento Doehlert 41
5.1.4 Perfis de desejabilididades para os metais estudados 48
5.2 Avaliação do modelo proposto 51
5.2.1 Determinação dos analitos em carnes de bode aplicando o método de preparo de amostra otimizado 52
5.2.3 Preparo de amostra por solubilização com TMAH 52
5.2.4 Ultrassom no tratamento das amostras de carne de bode 53
5.2.5 Decomposição por via úmida em bloco digestor e “dedo frio” 53
5.3 Avaliação do efeito de matriz 54
5.4 Validação da metodologia proposta 58
5.4.1 Linearidade 58
5.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LD) 59
5.4.3 Precisão (RSD) 60
5.4.4 Avaliação da recuperação dos analitos e exatidão do método 61
5.4.4.1 Teste de adição recuperação 61
5.4.4.2 Material de referência certificado 63
5.4 Comparação entre as concentrações dos analitos utilizando solubilização alcalina e decomposição por via úmida em bloco digestor e “dedo frio” 65
5.4.1 Aplicação da metodologia em amostras de carnes de bode 65
6. CONCLUSÕES 68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O rebanho de caprinos brasileiro é de 9,6 milhões de cabeças, o Brasil é considerado o 18º produtor mundial. A grande maioria está concentrada na região Nordeste que possui 93% desses animais. O Estado da Bahia concentra 26,7% do rebanho. Por razões climáticas e socioeconômicas esses animais apresentam maior capacidade de sobreviver em regiões com condições extremas de aridez e limitações topográficas. Esse potencial justifica-se no fato de que os caprinos apresentam grande resistência ao calor [1,2].

A média do teor de proteína nos caprinos comparando com outras carnes são semelhantes. Esse teor varia conforme a idade de abate, havendo uma tendência de acréscimo da quantidade de proteína na carne com o avanço da idade. A espécie caprina como produtora de carne oferece maior contribuição, não no sentido quantitativo, mas sim no sentido social, por ser fonte primordial de proteínas para povos habitantes de regiões como a África, o nordeste brasileiro e outras localidades cujas condições de vida são difíceis [3].

Atualmente a maioria dos métodos proposto para determinação de minerais em alimentos ainda utilizam procedimentos de preparo de amostras convencionais, como calcinação, digestão ácida por via úmida em frasco aberto e digestão ácida por via úmida em micro-ondas, cujos esses procedimentos são algumas vezes morosos e normalmente são utilizados reagentes concentrados, altas temperaturas e pressões, aumentando as possíveis contaminações, perdas de analitos voláteis e o risco de acidentes [4]. Diante disso, procedimentos para preparo de amostras que sejam simples, rápidos, eficientes e que apresentem baixos custos têm sido cada dia mais difundido, dentre esses procedimentos destaca-se a extração assistida por ultrassom [5].

As ondas ultrassônicas utilizadas para extrações apresentam simplicidade de operação, sendo eficientes para a realização de extração de elementos em amostras de alimentos, facilitando o procedimento, a suspensão do material sedimentado, além de promover a quebra de células vegetais. Nesse cenário a ação do ultrassom tem sido considerada como uma alternativa de efetiva ajuda por facilitar e acelerar a extração de compostos orgânicos e inorgânicos de diversos tipos de amostras de forma a promover dispersões e homogeneizações eficientes [6,7].

A etapa de pré-tratamento das amostras pode ser considerada a mais lenta e propensa a erros em procedimentos analíticos, o que aumenta a probabilidade de grandes desvios nos

resultados finais. Para obtenção de melhores resultados, a preparação da amostra deve apresentar alguns requisitos importantes como simplicidade, velocidade de execução, a possibilidade da aplicação em diferentes amostras, e uso de poucos volumes de reagentes.

As dissoluções alcalinas apresentam-se como uma interessante alternativa para o preparo de amostras de um grande número de analitos para diferentes tipos de determinações e caracterizam-se geralmente por serem procedimentos de rápida execução. A maioria dos procedimentos de preparação de amostra, antigos e recentes, é baseada no uso de ácidos concentrados para promover ataque agressivo, especialmente sob temperaturas elevadas e/ou pressões elevadas. Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos que foram utilizados o hidróxido de tetrametilamônio, levando ao desenvolvimento de procedimentos de preparação de amostras adequadas, envolvendo solubilizações antes de determinações utilizando técnicas espectroanalíticas [8].

As dissoluções com Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH) pode ser utilizado como método comparativo ou até mesmo como alternativa principal às digestões ácidas para o preparo de amostras proteicas, que na maioria das vezes são de difícil solubilidade em meio aquoso. Trata-se de um líquido incolor com forte odor de amina, completamente solúvel em água e estável a temperatura ambiente. A solubilização com TMAH é um tipo de tratamento simples, rápido e que necessita de pequenas quantidades do reagente, resultando assim pequenos volumes de diluição para análises. Outra grande vantagem é a longa estabilidade das soluções preparadas, podendo atingir meses, o que justifica o destaque e popularidade atingidos por esse reagente nos últimos tempos [8,9].

As dissoluções utilizando TMAH concordam muito bem com os resultados obtidos utilizando a digestão convencional, cujo procedimento requer a presença de ácidos fortes e de aquecimento. Os procedimentos que empregam dissoluções com TMAH envolvem em geral uma dissolução completa ou parcial da amostra. Normalmente as variáveis, temperatura, tempo, tipo de agitação (mecânica ou por ondas ultrassônicas) são relacionadas com a eficiência do método. Ressalta-se, porém, que essas variáveis dependem da natureza da amostra [10].

Nesse trabalho, desenvolveu-se um método baseado na solubilização alcalina assistida por ultrassom para a determinação de cálcio, cobre, ferro, magnésio e zinco em amostras de carne de bode e detecção por F AAS e Na e K por F AES. Para isso, aplicou-se métodos multivariados na otimização das variáveis do método. Empregou-se o planejamento fatorial

completo seguido da matriz Doehlert, como metodologia de superfície de resposta para a determinação das condições ótimas, foram obtidas também as desejabilidades individuais e global das condições otimizadas.

O método desenvolvido foi avaliado a partir da solubilização das carnes de bode com o TMAH mediante quantificação dos analitos em todas as amostras e teve como parâmetros de validação: limite de detecção e quantificação, linearidade das curvas analíticas, precisão mediante determinação de desvio padrão relativo e exatidão através do material de referência certificado. Esse método foi aplicado na determinação de cálcio, cobre, ferro, magnésio, potássio, sódio e zinco em cinco amostras de carnes de bode adquiridas em estabelecimentos comerciais em municípios do Estado da Bahia (Jequié, Maracás, Lajedo do Tabocal, Jaguaquara e Manoel Vitorino).

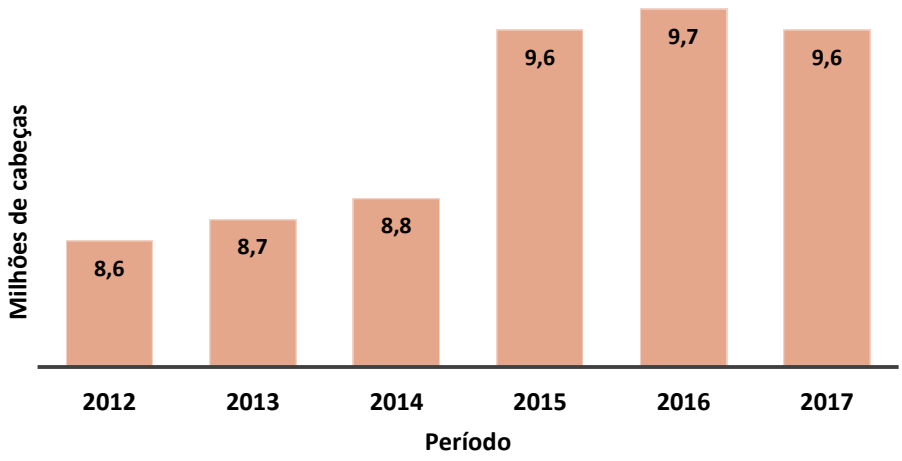
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A origem e raças de caprinos no Brasil

Os caprinos tiveram origem no Oriente, na Ásia Central, e chegaram à Europa através de invasões realizadas por guerreiros asiáticos, por meio de caminhos variados e em diferentes épocas. No Brasil os caprinos foram trazidos pelos colonizadores portugueses, holandeses e franceses. Entretanto apenas em 1910 ocorreram as importações de animais considerados com grande potencial para produção. Atualmente os caprinos estão distribuídos em quase todas as regiões do planeta representando uma importante atividade socioeconômica principalmente para as populações dos países em desenvolvimento [11,12].

O rebanho mundial de caprinos é de 1,06 bilhões de cabeças, das quais grande parte estão em regiões tropicais secas e subtropicais. A Índia possui o maior rebanho mundial, com 154 milhões de cabeças, em seguida vem a China e o Paquistão. No Brasil, o IBGE contabilizou em 2017 um rebanho de 9,6 milhões de cabeças (Figura 1). O rebanho da região Nordeste é o mais significativo do país, possuindo 9,0 milhões de caprinos sendo correspondente à aproximadamente 93% dos caprinos do Brasil, obtendo um crescimento de 18% entre 2006 e 2017. A Bahia possui 2,74 milhões desses animais. A maioria das espécies de caprinos são criados em condições difíceis, para a obtenção de carne e pele, porém existem alguns criatórios no próprio Nordeste que têm desenvolvido a caprinocultura voltada para a produção de leite [13, 2].

Figura 1 – Efetivo do rebanho de caprinos no Brasil entre os anos de 2012 a 2017



Fonte: [13]

2.2 Qualidade e aceitabilidade da carne caprina

Apesar do consumo da carne caprina não ser tão significativo entre os brasileiros, o Brasil está entre os países que mais produzem esse alimento. Sendo considerada como uma carne saborosa, suave, macia e que oferece diversas opções no seu preparo, a carne caprina é servida no Nordeste aos mais variados públicos, de restaurantes de gastronomias requintadas até residências simples [14].

Atualmente as raças mais difundidas no Brasil são a Saanen e Alpina. Os caprinos de raças Moxotó e Canindé apresentam padrões reconhecidos e homologados junto à Associação Brasileira de Criadores de Caprinos. Os Moxotó são animais destinados para a produção de pele, mas que estão sendo melhorados para a produção de carne. Os de raças Canindé apresentam dupla aptidão, produzem leite e carne. No entanto, a principal raça utilizada no Brasil para produção de carne é a Anglo-Nubiana apesar de também ser considerada de aptidão mista [15].

A má qualidade dos produtos, falta de padronização dos cortes e falta de locais adequados para comercialização são fatores que afetam a produtividade, qualidade e consequentemente um menor consumo da carne caprina pelos brasileiros. No entanto, seu consumo possui elevado potencial de crescimento, considerando os mercados internos e externos que têm apresentado de acordo com as últimas pesquisas uma maior aceitação da carne caprina. Porém é necessário que alguns aspectos como os que já foram citados anteriormente sejam melhorados para que a demanda seja atendida em quantidade e qualidade [16].

A qualidade da carne pode ser avaliada subjetiva ou objetivamente. Na primeira situação esse parâmetro não pode ser medido por se tratar de algo próprio para cada consumidor. Por outro lado, quando a qualidade é cientificamente mensurável, essas características são consideradas qualidades objetivas [17].

A maioria dos consumidores independente da região, buscam carnes semelhantes principalmente quanto a maciez, sendo essa característica mais estudada, seguida da suculência. Esses atributos de textura são utilizados pelos consumidores para determinar a qualidade e aceitabilidade da carne. Nesse contexto existem a clientela considerada mais esclarecida que buscam carnes que além de atender os requisitos de qualidades relacionadas de forma sensorialmente que atenda também quanto aos benefícios à saúde humana [22].

Os cortes de carnes caprinas para animais mais jovens disponibilizados no mercado, não são padronizados, sendo essa iguaria comercializada como “metade dianteira” e “metade traseira. Diante disso, existe uma necessidade de capacitação tanto de produtores quanto de empresário com a finalidade de incluir no mercado, cortes padronizados [18].

Com a expansão do mercado e a exigência do consumidor cada dia mais por produtos de melhor qualidade, surge a necessidade de maior controle tanto na produção quanto na comercialização desses animais, a qual influenciará significativamente na aceitabilidade desses produtos pelo consumidor. Além disso, é necessário explorar também através de marketing o destaque de valor nutricional e seu potencial para elaborar produtos derivados da carne caprina [18,19].

2.3 Características físico química da carne de bode: idade do abate

Em alguns estados no Nordeste ainda há muito preconceito em relação ao consumo da carne de bode com idade avançada por apresentar menor maciez, textura mais firme e um sabor e odor característico mais intenso. Por isso, são preferidos animais mais jovens (1 a 2 anos) por existir relação entre a suculência da carne e a idade do animal. Com isso, quanto menor a idade maior será a suculência da carne, e isso está diretamente relacionado com a maior capacidade de retenção de água e menores perdas no processo de cozimento [20,21].

Carne pode ser considerada como o tecido muscular de animais que são adquiridas com o abate do animal onde ocorrem transformações químicas e biofísicas, sendo constituída principalmente por proteínas, gorduras e água. Contém aminoácidos, minerais e vitaminas considerados essenciais à nutrição humana. Porém, mesmo apresentando diversos benefícios nutricionais, a carne vermelha pode proporcionar níveis altos de gordura podendo ocorrer variações dependendo da alimentação do animal, idade de abate, genética, região corporal, entre outros [22].

Em função de suas propriedades, o consumo da carne caprina tem aumentado nos últimos anos. Esta é uma fonte proteica e com elevado valor biológico, destacando-se na composição de valor nutricional comparadas a outras proteínas. Apresenta baixos teores de colesterol, gordura saturada e calorias. Essas características a torna uma carne magra (0,6-2,6% de gordura), quando comparada com a de bovino (17% de gordura). Considerado um alimento digestível e saudável [15,23,24].

Comparada à distribuição de gordura em outras espécies de ruminantes, na carcaça caprina é bastante diferente. O principal depósito de gordura (50 - 60%) está localizado entre o abdômen e as vísceras, sendo desta maneira eliminado no processo de evisceração [15].

Como descrito anteriormente, o sabor e odor das carnes caprinas, são característicos do animal e são acentuados com o avanço da idade. Existem na literatura diversos estudos voltados para os fatores que afetam a produção, características sensoriais e físico-químicas da carne caprina principalmente relacionados aos fatores genéticos como por exemplo, raça, sexo e idade [25].

2.4 Oligoelementos/metais essenciais: biodisponibilidade em alimentos

Alguns metais desenvolvem funções consideradas vitais no organismo humano, por isso a carência de alguns deles pode desenvolver diversas doenças, como por exemplo, má formação óssea em crianças, devido à falta de cálcio, retardamento do crescimento pela ausência de zinco e a anemia ocasionada pela deficiência de ferro. A principal fonte desses elementos para os seres humanos são os alimentos, porém tornam-se também uma fonte de exposição de elementos considerados prejudiciais à saúde [26,27].

De acordo com o papel que a bioquímica do organismo exerce, os elementos podem ser classificados em essenciais e não-essenciais. Os não-essenciais, geralmente são tóxicos e não desempenham nenhuma função biológica conhecida, e mesmo em pequenas concentrações tendem a se acumular no organismo podendo acarretar inúmeras doenças como desordens neurológicas, metabólicas e câncer. Por outro lado, os elementos essenciais contribuem de forma significativa desempenhando importantes papéis para o bom funcionamento do metabolismo humano e sua carência também são responsáveis por diversas doenças. No entanto, alguns desses elementos podem tornar-se tóxicos quando estão presentes no organismo em elevadas concentrações [28].

Existem faixas de concentrações desses elementos essenciais que são consideradas benéficas ao organismo, ultrapassando esses limites, esses elementos podem ser letais. Diante disso, faz-se necessário quantificar os teores dos elementos nos alimentos, uma vez que tanto a deficiência ou excesso dos mesmos, podem ocasionar diversas consequências, algumas irremediáveis [29,30].

2.5 Metais essenciais e a importância nutricional

2.5.1 Cálcio

Caracterizado como o mineral mais abundante do corpo humano, o cálcio é essencial para a mineralização de ossos e dentes, além de regular eventos intracelulares em diversos tecidos tornando-o um nutriente essencial necessário em diversas funções. O principal reservatório no organismo é o esqueleto que juntamente com os dentes armazena 99% total de cálcio, sendo importante também para o sangue e sistema nervoso central [31].

Na infância o cálcio é necessário para o processo de crescimento, e para adultos e idosos, tem a função de compensar as perdas diárias desse mineral, ou seja, ao ritmo que nas primeiras décadas da vida prevalece a formação óssea, a sua perda aumenta com o envelhecimento. Caso ocorra mais perda de cálcio do que é absorvido, o organismo irá retirar cálcio dos ossos, com a finalidade de manter o nível do mineral adequado que circula no sangue. Sua deficiência levam a desmineralização do esqueleto, além de afetar algumas funções fisiológicas vitais ao organismo [32].

O organismo não produz cálcio, é necessário ingeri-lo na dieta humana. É através dos alimentos que o corpo humano recebe cálcio todos os dias, podendo ser ingerido de diversas fontes na alimentação, sendo mais abundante e disponível no leite bovino e derivados. Em produtos cárneos, a concentração de cálcio depende do tipo de carne e da quantidade que foi utilizada para a fabricação deste alimento [33].

Mesmo alguns alimentos que apresentam elevadas concentrações de cálcio, sua absorção pode variar muito devido a sua biodisponibilidade que é a capacidade que o nutriente possui em ser absorvido e utilizado pelo organismo. Dessa forma, nem todos os nutrientes ingeridos serão absorvidos em sua totalidade, pois existem nos próprios alimentos outros constituintes que por sua vez podem dificultar a forma de absorção dos nutrientes presentes nos alimentos ingeridos [34].

2.5.2 Ferro

No corpo humano, o ferro é responsável pela manutenção de processos vitais como carrear oxigênio no sangue. O ferro é considerado o elemento de transição mais abundante e mais conhecido no sistema biológico, sendo um dos elementos imprescindíveis para o

metabolismo das células. A anemia ferropriva tem como principal causa a insuficiência de ferro no corpo humano decorrente de perdas excessivas como por exemplos hemorragia, ingestão insuficiente ou a má absorção do nutriente [35,36].

Nos alimentos, o ferro pode estar presente de duas formas químicas: o ferro heme e não-heme. Na forma heme, o ferro é encontrado principalmente em carnes e vísceras, a forma não-heme está presente em alimentos de origem vegetal. Sua disponibilidade nos alimentos dependem das suas formas químicas, composição, algumas possíveis interações com outros constituintes além da combinação destes na dieta humana. A ingestão simultânea de alguns alimentos também podem aumentar a absorção de ferro pelo organismo, como carnes e alimentos ricos em ácidos orgânicos e vitamina C. Diante disso, faz-se necessário conhecer não somente as concentrações de ferro total nos alimentos, mas também sua composição e componentes que possam inibir a absorção desse mineral pelo organismo [37,38,39].

Quando as necessidades de ferro são maiores que as necessidades energéticas, ocorre maior riscos de deficiência desse mineral, como por exemplo, na infância e na adolescência devido o rápido crescimento e em gestantes onde essas necessidades são maiores. Quando os requisitos fisiológicos não são correspondidos através da absorção de ferro por meio da ingestão dos alimentos, surge a deficiência nutricional, que também pode ser controlada por meio de suplementação ou através da fortificação de alimentos tornando-se uma estratégia eficaz contra a deficiência de ferro [40].

2.5.3 Magnésio

O magnésio desempenha várias funções no corpo humano, auxilia nas funções neurológicas, no metabolismo das gorduras e no processo digestivo. Promove o bom funcionamento dos músculos e do coração, está envolvido em mais de 300 sistemas enzimáticos e atua na transmissão neuromuscular contribuindo assim para o desenvolvimento do feto, uma vez que participa na formação de novas proteínas. A deficiência desse mineral pode causar hipertensão, dores de cabeça de origem vascular, câimbras, fraqueza, tonturas, entre outros [41].

As maiores fontes de magnésio são verduras, cereais integrais, frutas e legumes verdes (o magnésio é constituinte da clorofila), amêndoas, caju e castanha. As carnes e leites

apresentam quantidades intermediárias desse mineral. Assim como a maioria dos minerais essenciais, sua biodisponibilidade varia de acordo com o ritmo alimentar [42].

A ingestão diária recomendável para atender as necessidades do corpo humano através de uma alimentação equilibrada para homens e mulheres é de aproximadamente 400 e 310 mg de magnésio, respectivamente. Após 30 anos de idade, essas recomendações tem um acréscimo em torno de 10% [42,46].

2.5.4 Zinco

O zinco é um elemento essencial às diversas funções bioquímicas do organismo humano. Muitos aspectos do metabolismo celular são dependentes do zinco, além do grande número de enzimas que necessitam do zinco para realizar reações químicas vitais. Desempenha papéis importantes no corpo humano, por exemplo, atua no crescimento, maturação sexual, funções imunológicas e neurológicas e ainda atua na estrutura das proteínas e membranas celulares. A sua biodisponibilidade, pode ser afetada no processo de absorção intestinal ou até mesmo na circulação sanguínea, com isso não será toda quantidade de zinco ingerida através da alimentação que de fato será utilizada pelo organismo. Alguns fatores da própria alimentação principalmente de origem vegetal podem diminuir a absorção intestinal de zinco como a presença de oxalato e polifenóis [43].

As principais fontes alimentares são carnes bovinas, frutos do mar, gérmen de trigo, sementes de abóboras, peixes, leites, castanhas, nozes entre outras. No geral os produtos de origem animal possuem as melhores fontes de zinco, tanto em conteúdo quanto em biodisponibilidade. Com isso as regiões em que os hábitos alimentares são principalmente de origem vegetal, a deficiência de zinco na alimentação é maior [44].

A deficiência de zinco no corpo humano devido inadequações alimentares pode ocorrer alterações neurossensitivas, concentrações reduzidas de testosterona sérica, redução de massa magra corporal, alterações em subpopulações de células, entre outros fatores. Dentre os sintomas da falta de zinco no organismo destacam-se: crescimento testicular, perda de pelos, redução do crescimento e lesões na pele [45].

2.5.5 Cobre

Em pequenas quantidades, o cobre é um elemento essencial aos organismos vivos, exercendo papel importante em diversas funções. A deficiência de cobre no corpo humano é muito rara, pois apenas cinco miligramas desse mineral já é suficiente para às necessidades do homem, e praticamente todas as dietas possuem alguns miligramas de cobre. No entanto, uma das manifestações da ausência de cobre é por meio de um tipo de anemia a qual o tratamento não é o consumo de ferro e sim a suplementação de cobre [46].

O organismo não o sintetiza cobre, sendo necessário recebê-lo através da alimentação. Na nutrição humana, os alimentos mais ricos em cobre são carnes, frutos do mar e oleaginosas. Esse último apresenta uma importância significante para o corpo humano, além de apresentarem maiores concentrações de cobre, são ricos em ácidos graxos insaturados, fibras, e fontes de proteína vegetal. Em geral concentrações de cobre podem variar de acordo com as condições de cultivo, como por exemplo, solo, água, o tipo de processamento utilizado, uso de embalagens ou utensílios de cobre e também o pH [47].

Embora esse mineral seja encontrado distribuído por todo organismo humano, as maiores concentrações são encontradas em órgãos como o rins e fígado, por apresentarem maiores intensidades de atividade metabólica.

2.5.6 Sódio

O sódio é essencial para o bom funcionamento do corpo humano. Entretanto o seu excesso nos alimentos não é necessário sendo um agravante que pode proporcionar muitos problemas como por exemplo, doenças cardiovasculares, elevação da pressão arterial, ganho de peso, pedra nos rins entre outros [48].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a população consome quantidades de sódio não recomendadas, o que a longo prazo causará doenças pela ingestão em excesso. O limite máximo considerado saudável para ser ingerido de sódio são 2g diária, porém o brasileiro consome em média 4,7g de Na diariamente. Estudos revelam que a diminuição do consumo reduz consideravelmente doenças cardiovasculares e outras doenças causadas por excesso desse mineral no corpo [49].

Por se tratar de um elemento essencial para o corpo humano, em doses recomendadas, o sódio apresenta pontos positivos. Entre eles destacam-se a regulação osmótica do sangue,

age no equilíbrio ácido-básico essencial para o funcionamento das células corporais, além da sua fundamental participação na transmissão dos impulsos nervoso e relaxamento muscular.

O cloreto de sódio, popularmente conhecido como sal de cozinha, é a principal fonte de sódio na alimentação, sendo este utilizado no processamento de alimentos, adicionado no preparo das refeições e processo industrializados, o que corresponde cerca de 90% de sódio ingerido pelo homem. O percentual restante estão presente em alimentos que possuem o sódio naturalmente em sua composição, principalmente alimentos de origem animal como ovos, carnes e leite. Dentre os alimentos industrializados com maiores concentrações de sódio estão, queijo parmesão, refrigerante, macarrão instantâneo, temperos, embutidos, balas e gelatinas [50].

2.5.7 Potássio

A ingestão do potássio é de extrema importância para prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Porém, em indivíduos portadores de insuficiência renal crônica, sua ingestão deve ser controlada pois seu acúmulo pode ocasionar entre outros efeitos, parada cardíaca. Desta forma seu excesso (hipercalemia) ou deficiência (hipocalemia) proporcionará problemas para a saúde. Sua ausência pode provocar hipertensão pois o potássio possui efeito anti-hipertensivo por induzir perdas de água e sódio [51,52].

As maiores concentrações de potássio podem ser encontradas em frutas e vegetais como abacaxi, banana, salsa e espinafre. Embora em menores quantidades, as carnes e leites, são considerados também uma boa fonte de obtenção desse mineral. De acordo com as novas diretrizes divulgadas pela OMS, o recomendável para ingestão diária na vida adulta é de 3510 mg. A agência especializada em saúde ainda relata que a população em geral consome menos potássio do que necessário e mais sódio do que é recomendado [53].

2.5.8 Composição de nutrientes e minerais em amostras de carnes caprina de acordo com a TACO, TBCA e USDA

Atualmente as tabelas TACO e TBCA se caracterizam como os melhores veículos informativos brasileiros no que se refere a composição de alimentos. A USDA é uma base de dados internacional e fornece tabelas complementares de dados analíticos específicos. No

entanto, apesar de bastante informativas e completas nesses projetos não são encontrados informações sobre a regulamentação para carnes de bode. São encontradas informações na TBCA e USDA referente a carnes caprinas apenas para cabras e cabritos. A TACO não traz informações para carnes caprinas (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição de minerais (mg/100 g) em amostras de carnes de cabra e cabrito de acordo com a TBCA e USDA

Fonte	Animal	Ca	Cu	Fe	Mg	K	Na	Zn
TBCA	Cabrito	4,63	N.I.	2,48	19,1	270	66,6	4,03
USDA	Cabra	4,00	N.I.	2,83	N.I.	385	82	N.I.

N.I.: Não informado.

2.6 Uso de energia ultrassônica na química analítica no preparo de amostras

Atualmente a maioria dos métodos proposto para determinação de minerais em alimentos ainda utilizam procedimentos de preparo de amostras convencionais, como calcinação, digestão ácida por via úmida em frasco aberto e digestão ácida por via úmida em micro-ondas. Esses procedimentos são morosos e normalmente são utilizados reagentes concentrados, altas temperaturas e pressões, aumentando as possíveis contaminações e o risco de acidentes [4]. Diante disso, procedimentos para preparo de amostras que sejam simples, rápidos, eficientes e que apresentem baixos custos têm sido cada dia mais difundidos. Dentre esses procedimentos destaca-se a solubilização assistida por ultrassom. Este processo é baseado na ação de ondas mecânicas consideradas de baixas frequências, e que são responsáveis pela formação e esgotamento de microbolhas que resultará em áreas de alta pressão e temperatura na solução [5].

As configurações mais utilizadas para geração do ultrassom (banhos ou sondas) são geradas pela localização de elementos piezelétricos. Os transdutores são submetidos a um campo elétrico, sofrendo dessa forma deformações eletroelastomecânicas, e obtendo como resultado as ondas ultrassônicas [54].

Através de ondas acústicas de frequências entre 20 e 1000 kHz ocorre a sonicação de um líquido que promove à agitação e o aquecimento do meio, podendo assim, ocorrer a cavitação acústica. Esse fenômeno envolve as seguintes etapas: nucleação, crescimento e colapso de microbolhas em líquidos. Tendo-se início na etapa de rarefação das ondas acústicas no momento em que moléculas de gases e vapores que estão presente no líquido são direcionadas para o interior dos núcleos que são produzidos através da formação de microbolhas, devido a mudanças de pressão ocorridas quando uma onda acústica passa da fase de rarefação para a fase de compressão [54].

Na etapa de compressão não há a extinção dessas microbolhas, pois apenas poucas moléculas dos gases contidos nas bolhas serão expulsas de seu interior ao serem direcionadas para o meio líquido. Com isso, nos ciclos seguintes, as dimensões das microbolhas, aumentarão até atingir um diâmetro de aproximadamente 170 µm em água pura a 20 kHz, nas quais sob essas condições ocorrerá o colapso, implodindo no ciclo seguinte de compressão [54].

Quimicamente os efeitos que a ultrassom provoca está diretamente relacionado à migração de moléculas para bolhas de cavitação e as altas temperaturas e pressões atingidas durante o colapso dessas microbolhas. Isso resulta em maior agitação do solvente e maior superfície de contato entre o sólido e o solvente, acarretando na facilidade de infiltração do solvente na matriz em análise [54, 32, 33].

As ondas ultrassônicas utilizadas para solubilizações, apresentam simples operação, sendo eficiente para solubilizar elementos em amostras de alimentos pois esta facilita a liberação dos analitos para a solução. Permite a sedimentação do material em suspensão além de promover a quebra de células vegetais. Nesse cenário à ação do ultrassom tem sido considerada como uma alternativa de efetiva ajuda por facilitar e acelerar solubilização e extração de compostos orgânicos e inorgânicos de diversos tipos de amostras de forma a promover dispersões e homogeneizações eficientes [7,55].

O preparo de amostras de carnes para análise elementar, normalmente requer a conversão do material orgânico sólido em solução. Dentre as mais variadas formas para tal procedimento, as mais utilizadas são: decomposição por via seca (forno de mufla), decomposição por via úmida com frasco aberto e decomposição por via úmida com frasco fechado [56].

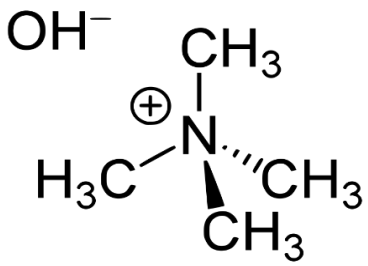
2.7 Solubilização alcalina com Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH)

O preparo da amostra é considerada a etapa mais crítica de um procedimento analítico, e a escolha desse tratamento irá depender do tipo de amostra analisada, dos analitos de interesse, da técnica analítica disponível, além da precisão e exatidão desejadas. Diante disso, é esperado que essa etapa seja de menor tempo, pouco gasto de reagentes e geração de resíduos, e que minimize possíveis fontes de contaminação para que desta forma proporcione os melhores resultados.

Dentre as mais variadas formas de preparo de amostras, o emprego de meio alcalino é considerado uma ótima alternativa para solubilização de muitas matrizes, sendo esta uma abordagem aplicável a um grande número de analitos, sendo este um procedimento rápido, simples e de alta eficiência [57].

Nesse contexto, um reagente que tem sido largamente utilizado é o Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH), apresentando fórmula $(CH_3)_4NOH$ (Figura 2). O TMAH possui forte odor de amina, completamente solúvel em água e estável em temperatura ambiente. Comercializado com elevado grau de pureza, está disponível na forma de solução a 10-25% m/v em água ou 25% em metanol e apresenta pH entre 13,4 - 14,7 [58,41].

Figura 2 – Fórmula estrutural do Hidróxido de Tetrametilamônio



Fonte: [59]

A utilização do TMAH para dissolução de materiais biológicos foi proposto na década de 70 como uma alternativa à digestão convencional para determinação de diversos compostos inorgânicos. Considerado um reagente eficiente na solubilização de amostras

proteicas, o TMAH tem sido amplamente utilizado como estratégia para preparo de amostras [60].

Na literatura existem alguns estudos aplicados com esse reagente, como por exemplo, sangue, cabelos, unhas e tecidos proteicos. A maioria desses trabalhos enfatizam a redução de tempo e de manipulação/supervisão no processo de preparo de amostras com o TMAH [8].

Esse reagente alcalino pode ser utilizado como método comparativo ou como alternativa principal a outros métodos convencionais de preparo de amostras, como por exemplo às digestões ácidas. As solubilizações com TMAH proporciona metodologias rápidas e simples no preparo de amostras homogeneizadas, não sendo necessários aquecimentos, ou quando são utilizados, apenas um aquecimento brando, evitando perdas de analitos voláteis. Em alguns trabalhos são utilizados agitação magnética ou ondas ultrassônicas, com a finalidade de diminuir o tempo necessário da solubilização alcalina bem como aumentar a taxa de solubilidade [61].

Outras vantagens da utilização do TMAH é que são necessários pequenos volumes do reagente (normalmente na faixa do µL), e dependendo da sua pureza, baixos valores de brancos são obtidos, consequentemente melhorando o limite de detecção dos analitos na amostra em estudo [61].

O TMAH promove a clivagem da amostra em fragmentos menores, facilitando assim a dissolução da matriz estudada. Sendo capaz de dissociar as espécies químicas e complexar-se efetivamente com diversos elementos. A eficiência da solubilização dependerá dentre outros fatores do tipo de matriz, o tamanho das partículas sólidas, a forma de homogeneização, o tempo e a concentração do reagente utilizado [57].

Embora o preparo de amostras com esse reagente possua muitas vantagens comparadas com outros métodos, não é considerado um reagente universal por não ser eficiente na solubilização de todos os tipos de amostras, restringindo sua eficiência principalmente para amostras biológicas e proteicas. Destaca-se como limitações sua alta viscosidade e dificuldade de purificação do reagente [62,63,10].

Na literatura existem poucas informações sobre a toxicidade do TMAH, mas sabe-se que vapores deste reagente causam irritação no nariz, garganta e sistema respiratório. A sua absorção através da pele pode provocar queimaduras de até terceiro grau. Entre os sintomas citados, entre outros, podem estar associados a degradação do TMAH gerando

tetrametilamônio (TMA) ou tetramina, que é um composto de amônio quarternário tóxico [64,65].

As soluções preparadas com TMAH possuem longa estabilidade podendo atingir meses, o que justifica o destaque e popularidade atingidos por esse reagente nos últimos tempos. O tempo necessário para preparação de amostras utilizando esse reagente é reduzido cerca de 500 vezes e o volume cerca de 20 vezes menor em comparação a métodos convencionais para preparo de amostras. Além disso, é solúvel em água e álcool podendo complexar e estabilizar elementos voláteis [66].

De modo geral, as solubilizações empregando o TMAH, envolvem uma dissolução completa ou parcial da amostra, e permite obter uma solução ou suspensão bastante estável em meio aquoso. Esta estabilidade tem como consequência a não alteração do estado de oxidação das espécies inorgânicas, possibilitando estudos de especiação [56].

Diversos trabalhos na literatura relatam a concordância do TMAH com outros métodos de preparo de amostras convencionais, além de apresentarem precisão e exatidão satisfatórias e bom desempenho dos instrumentos utilizados como técnicas de detecção. Diferentes tratamentos para a solubilização são reportadas na literatura para diversas amostras [64,67,68,69,70]. Na Tabela 2 estão expressos alguns trabalhos da literatura que utilizaram TMAH para o preparo das amostras.

Tabela 2 – Trabalhos descritos na literatura sobre o preparo de amostras com Hidróxido de Tetrametilamônio para determinação de metais

Amostra	Elementos	Preparo da amostra	Técnica	Resultados segundo os autores	Referências
Sangue	Hg	Temperatura ambiente	FI-CV ICP-MS	Método simples e de fácil aplicação para laboratório de rotina.	[68]
Tecidos biológicos (peixe, músculo bovino e fígado bovino).	Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb, Sb, Se, Sr, V e Zn	Temperatura ambiente por 12 horas	ICP-MS	Método simples, não exigindo instrumentação dispendiosa, supervisão constante da digestão da amostra. Após a preparação, as amostras são estáveis a -20 ° C durante 3 dias.	[69]
Café instantâneo	Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr e Zn	Centrifugação	ICP OES	Uma alternativa simples e rápida para concluir os procedimentos de decomposição da amostra e pode ser facilmente aplicado para análises de rotina.	[71]
Unhas	Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn	Temperatura ambiente e centrifugação	GF AAS e ICP-MS	Maior frequência de análise em comparação com a decomposição convencional.	[72]
Peixes	Ca, Fe, Mg e Zn	Energia ultrassônica	F AAS	O uso da energia ultrassônica promoveu uma solubilização mais eficiente, garantindo boas características analíticas.	[73]
Amostra	**Elementos**	**Preparo da amostra**	**Técnica**	**Resultados segundo os autores**	**Referências**

Couro	Cr e Pb	Banho maria (95 ºC)	F AAS	Simplicidade do procedimento para a preparação de amostras, a quantidade reduzida de reagentes e minimização dos riscos de contaminação tornam esse procedimento excelente alternativa para a preparação de amostras de couro.	[74]
Biodiesel	Cu e Fe	Banho maria (90 ºC))	G FAAS	O tratamento com TMAH evita a contaminação da amostra e a perda de analito, sendo simples, rápido e preciso.	[75]
Carne fresca	Ca, Cu, Fe e Mg	Temperatura ambiente e com banho maria	GFAAS e F AAS	O método simples, rápido e confiável para análises de produtos cárneos e não requer equipamento especial, nem ácido forte para a preparação da amostra.	[76]
Enlatados e carnes bovina e suína	K, Mg, Na e Zn	Temperatura ambiente por 12 horas	F AAS e FAES	Metodologia adequada, sensível e reprodutível.	[77]
Óleos comestíveis	Cu, Ge, Mn, Mo, Ni, Sb, Sr, Ti e V	Banho maria (90 ºC)	ICP-MS	As amostras de óleos comestíveis foram devidamente solubilizadas com TMAH, baixos limites de detecção foram obtidos, comparada a procedimentos convencionais.	[78]

Amostra	Elementos	Preparo da amostra	Técnica	Resultados segundo os autores	Referências
Peixes e camarão	Pb e Cd	Temperatura ambiente por 2 horas	GF AAS	Os resultados mostraram adequados para o método desenvolvido.	[79]
Carne	Na e K	Overnigth em temperatura ambiente	F AAS e F AES	Estabilidade dos analitos por pelo menos 3 meses.	[80]
Batons	Pb	Banho maria (60 ºC)	GF AAS	A solubilização alcalina evita a contaminação da amostra e a perda de analito.	[81]

Dentre os procedimentos de solubilização empregando TMAH citados na Tabela 2, foram realizados sem aquecimentos, com aquecimentos variando entre 50 e 95 ºC, agitação e ultrassom.

No geral, os trabalhos realizados com o preparo das amostras em meio alcalino de TMAH, descrevem ser um procedimento, rápido, simples e eficiente para solubilização de diversas amostras que podem ser realizados em temperatura ambiente sem necessidade de aplicações de energias para aquecimentos. Embora a maioria dos trabalhos listados acima utilizaram temperatura ambiente para solubilização das amostras, alguns realizaram o procedimento sob aquecimento, com a finalidade de minimizar o tempo, acelerando ainda mais o processo de dissolução das amostras. A primeira vez que o TMAH foi utilizado para preparo de amostras foi em 1973, para solubilização de tecidos animais comparando o desempenho da amostra em temperatura ambiente e sob aquecimento brando (65 ºC).

A simplicidade aliada a alta eficiência, são algumas das qualidades mais citadas na literatura sobre a utilização desse reagente. Portanto, a solubilização com TMAH torna-se uma alternativa interessante aos métodos convencionais para preparo de amostras, oferecendo entre outras vantagens, não utilização de ácidos concentrados e a diminuição dos riscos de perdas por volatilização e contaminação. O uso de TMAH torna-se ainda mais atraente para laboratórios não equipados com sistemas de decomposição sofisticados, como por exemplo, fornos de micro-ondas [74].

Além dos trabalhos citados acima, dentre outros, Nóbrega *e colaboradores*, discutem diversos trabalhos numa revisão de literatura em que foram utilizados o meio alcalino para preparo de amostras, especialmente o TMAH. Informações sobre o tipo de analito, a amostra utilizada, as condições que foram desenvolvidas nos procedimentos e observações segundo os autores, são discutidas nessa revisão [8].

Atualmente muitos trabalhos da literatura testaram a eficiência da solubilização alcalina com TMAH, propondo métodos alternativos para preparo de amostras diversas, como por exemplo amostras de carnes, onde resultados satisfatórios foram obtidos após a comparação com metodologias já validadas como digestão por via úmida [9].

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico simples com base em dissolução alcalina com Hidróxido de Tetrametilamônio para determinação de Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Na e K em carne de bode comercializadas na região Sudoeste da Bahia.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o desempenho do reagente alcalino na solubilização de amostras de carnes de bode através do desenvolvimento de uma metodologias para determinação de metais por F AAS e F AES;

Utilizar técnicas de planejamento experimental (planejamento Doehlert e desejabilidade) na otimização de variáveis do método analítico;

Validar a metodologia de pré-tratamento utilizando solubilização alcalina visando a determinação de metais em carnes de bode obtendo seus parâmetros de mérito;

Aplicar a metodologia otimizada em amostras de carnes de bode adquiridas em açougues de Jaguaquara-Ba, Maracás-Ba, Manoel Vitorino-Ba, Lagedo do Tabocal-Ba e Jequié-Ba;

Comparar a eficiência do método proposto com a decomposição por via úmida em bloco digestor.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

Um espectrômetro de absorção atômica com chama (F AAS) Perkin Elmer, (Norwalk, CT, EUA), modelo AAnalyst 200 equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo foi utilizado para as medidas de absorvância. A chama foi composta por ar atmosférico e acetileno. Os valores de comprimentos de ondas para as lâmpadas de cátodo oco (HCL) utilizadas nas determinações de Cálcio, Cobre, Ferro, Magnésio, e Zinco foram de 422,67; 324,75; 248,33; 285,21; 213,06 respectivamente. A Tabela 3 descreve alguns parâmetros do espectrômetro de absorção atômica com chama sugeridos pelo fabricante e adotados nesse trabalho.

Tabela 3 – Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, e Zn

Parâmetros	Valores
Altura do queimador (mm)	13,5
Abertura da fenda (nm)	0,2
Vazão de fluxo do acetileno (L min^{-1})	2,0
Vazão de fluxo do ar (L min^{-1})	13,5
Vazão de fluxo do nebulizador (mL min^{-1})	5,0 a 7,0

4.1.2 Materiais

- Bloco de digestão (TECNAL), modelo 040125 com tubos digestores de vidro e dedo frio;
- Micropipetas (Transferpette Digital - Brand, RB704174, RB704178; Sealpette ER 33832; Kacil S; ponteiras (Brand, 18170, 18266, 702533);
- Refrigerador (CONSUL, modelo CRA28888NA);
- Sistema de purificação de água QUIMIS (São Paulo, Brasil);

- Equipamento de banho Ultrassom, Cristófoli (Cristófoli, Campo Mourão - PR)
- Liofilizador, Modelo K 105, Litop;
- Balança analítica Modelo AX200, Shimadzu. Filipinas;
- Vidrarias convencionais, mantida em solução de HNO_3 5% (v/v) durante 24 horas para descontaminação e posteriormente enxaguada com água deionizada.

4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

- Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH) ($(CH_3)_4NOH$) (25% v/v em água) – da marca Merck KgaA (Darmstadt Germany USA);
- Ácido nítrico 65% (m/m) (F.Maia, Santo André - SP);
- Peróxido de hidrogênio (Êxodo Científica, Hortolândia – SP);
- Soluções padrões de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn para AAS (Sigma-Aldrich, Suíça).

4.3 Métodos

4.3.1 Preparo das soluções de cálcio, cobre, ferro, magnésio, zinco, sódio e potássio

As soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida de um deionizador Permution (Labnorte, Salvador - BA). Realizou-se a diluição de uma solução estoque de cálcio, cobre, ferro, magnésio, zinco, sódio e potássio a 1000 ± 2 μg mL^{-1} (padrão para absorção e emissão atômica) com água deionizada a fim de obter as concentrações relativas às curvas analíticas.

4.3.2 Pré-tratamento da amostra

As amostras de carnes de bode *in natura* foram adquiridas em cinco açougues de municípios localizados no Sudoeste da Bahia (Jaguaquara, Jequié, Lagedo do Tabocal, Manoel Vitorino e Maracás), cortadas com faca de aço inoxidável retirando todas as partes adiposas das carnes a fim de minimizar as possíveis interferências desse tecido. Em seguida a

liofilização foi realizada eliminando toda água presente na amostra de carne. A secagem foi feita em liofilizador sob vácuo de aproximadamente 0,119 µm Hg e temperatura -90 ºC por 36 horas. Em seguida foram fragmentadas usando um liquidificador doméstico (Walita, modelo RI2102) sendo o copo descontaminado com HNO_3 5% (v/v). Após a cominuição as amostras foram acondicionadas em recipientes de poliestireno e mantidas em freezer em torno de - 18 ºC. As pesagens das amostras foram realizadas em papel do tipo manteiga e em balança analítica com resolução de 0,0001 g.

4.3.3 Etapa prévia de hidratação da amostra

De acordo com teste preliminares, foi observado que a etapa de hidratação é essencial antes da adição do TMAH na amostra de carne liofilizada. Este passo prévio de hidratação permite que o reagente penetre facilmente na matriz proteica e dissolva a amostra, libertando os metais estudados. Além disso, com os estudos preliminares foi possível concluir também que volumes muitos pequenos de TMAH sem a adição de água, eram insuficientes para umedecer a quantidade de amostra utilizada e desta forma partes da amostra ficariam inalteradas. Diante disso, foram adicionados aproximadamente 2 mL de água deionizada nas amostras antes de realizar a solubilização com o TMAH, garantindo assim a eficiência do procedimento. Na figura 3 encontra-se o esquema utilizado para solubilização das amostras.

Figura 3 – Esquema do procedimento geral para solubilização das amostras de carnes de bode

4.4 Decomposição por via úmida em sistema aberto com bloco digestor

A decomposição em sistema aberto foi efetuada em bloco digestor. Foi utilizado 0,5g da amostra liofilizada, adicionou-se 5,0 mL de ácido nítrico concentrado e 2 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi aquecida (110-120 ºC) por aproximadamente 120 minutos. Os brancos da digestão foram preparados do mesmo modo que as amostras para digestão, porém nessa condição não foi adicionado a amostra. Após o resfriamento para temperatura ambiente, as amostras foram transferidas para tubos Falcon e diluídas para um volume final de 10,0 mL com água deionizada. As determinações dos metais foram então realizadas por F AAS e F AES. Os resultados obtidos da quantificação dos metais em estudo presentes na amostra foram expressos em termos de mg/g. Esses resultados foram comparados com os determinados por diluição utilizando TMAH. O sistema de decomposição utilizado neste trabalho pode ser visualizado na Figura 4. Sistema de decomposição por via úmida em bloco digestor e "dedo frio"

Figura 4 – Sistema de decomposição por via úmida em bloco digestor e "dedo frio"

Fonte: Acervo de fotos da autora

4.5 Solubilização em meio alcalino utilizando energia de ultrassom

O processo de solubilização das amostras foi realizado utilizando um equipamento de banho ultrassônico. Adicionou-se a cuba do equipamento de ultrassom aproximadamente 2,8 L de água e foram utilizados tubos de centrífuga de vidro contendo a amostra devidamente pesada, o reagente TMAH e água deionizada. Esses tubos foram colocados em seu interior, um por vez, sempre na mesma posição (no centro da cuba de ultrassom) realizando dessa maneira a solubilização assistida de ultrassom (Figura 5).

Após a otimização com o planejamento Doelhert, foram adotados os valores ótimos encontrados para realizar os procedimentos seguintes desenvolvidos nessa pesquisa.

Figura 5 – Equipamento ultrassônico utilizado para solubilização com TMAH

Fonte: Acervo de fotos da autora

4.6 Otimização multivariada

A otimização multivariada foi empregada para encontrar as melhores condições de tratamento das amostras de carnes de bode para determinação de Ca, Fe, Mg, Zn e Cu por F AAS e Na e K por F AES. O planejamento fatorial foi usado para indicar as variáveis

significativas e as tendências, bem como as possíveis interações das variáveis na determinação dos analitos.

Depois de estabelecidas as variáveis significativas e a ocorrência ou não de interação entre elas, utilizou-se outra ferramenta de análise multivariada: o planejamento Doehlert. Esse planejamento foi usado para descrever, com maior exatidão, o comportamento dos dados e, dessa forma, fazer previsões sobre as condições ótimas para a solubilização da amostra. As delimitações dos valores adotados para cada variável no planejamento Doehlert foi estabelecido com as tendências apontadas pelo planejamento fatorial. Dessa forma, as variáveis indicadas como significativas pelo planejamento fatorial foram otimizadas pelo planejamento Doehlert.

4.6.1 Planejamento fatorial 2^4

Foi desenvolvido um conjunto de experimentos sendo estabelecido por meio da combinação de diferentes variáveis envolvidas no preparo da amostra. Um planejamento fatorial 2^4 foi realizado totalizando 16 experimentos em duplicatas com a finalidade de avaliar as variáveis significativas no procedimento, sendo consideradas as seguintes variáveis: massa da amostra, volume de TMAH, tempo de sonicação e temperatura do banho ultrassônico. As tabelas 4 e 5 mostram os valores mínimos e máximos e a matriz experimental adotados nesse planejamento.

Tabela 4 – Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2^4 para a investigação prévia dos fatores que afetam a dissolução da amostra em TMAH assistida por energia de ultrassom

Variável	(-)	(+)
(1) Volume de TMAH (µL)	200	1000
(2) Massa da amostra (g)	0,1	0,5
(3) Tempo de sonicação (min)	5	15
(4) Temperatura (ºC)	25	50

Tabela 5 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^4 para investigação dos fatores que afetam a dissolução da amostra em TMAH assistida por energia de ultrassom

Experimento	1	2	3	4
1	-	-	-	-
2	-	+	-	-
3	+	-	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	-	+	+	-
7	+	-	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	-	+	-	+
11	+	-	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	-	+	+	+
15	+	-	+	+
16	+	+	+	+

4.6.2 Processo de otimização com o planejamento Doehlert

O planejamento Doehlert é considerado adequado e eficiente na otimização de vários procedimentos experimentais principalmente pela sua facilidade de aplicação nas variáveis, por necessitar de poucos ensaios, possibilitar grande mobilidade do domínio experimental (permitindo a construção de planejamentos sequenciais onde é esperada a resposta máxima),

além da possibilidade de selecionar a quantidade de níveis para cada fator com a finalidade de obter uma maior quantidade e qualidade de informações [83].

Para este modelo, o número total de experimentos é dado por $N = k^2 + k + C_o$, onde N é o número de experimentos, k é o número de variáveis e C_o, o número de pontos centrais. Replicatas são necessárias apenas no ponto central para efetuar a análise de variância [82].

O domínio experimental do planejamento Doehlert tem um formato de um cubo octaedro (Figura 6), e para três fatores apresenta três diferentes possibilidades sendo: (a) projeção sobre uma face quadrada, (b) é a projeção sobre uma face triangular e (c) é a projeção sobre um vértice [84]. Essas projeções podem ser observadas na Figura 7.

Figura 6 – Representação espacial de um cubo octaedro

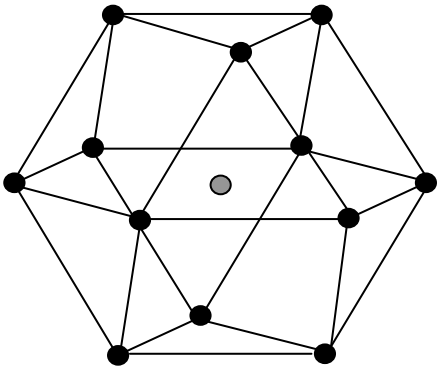
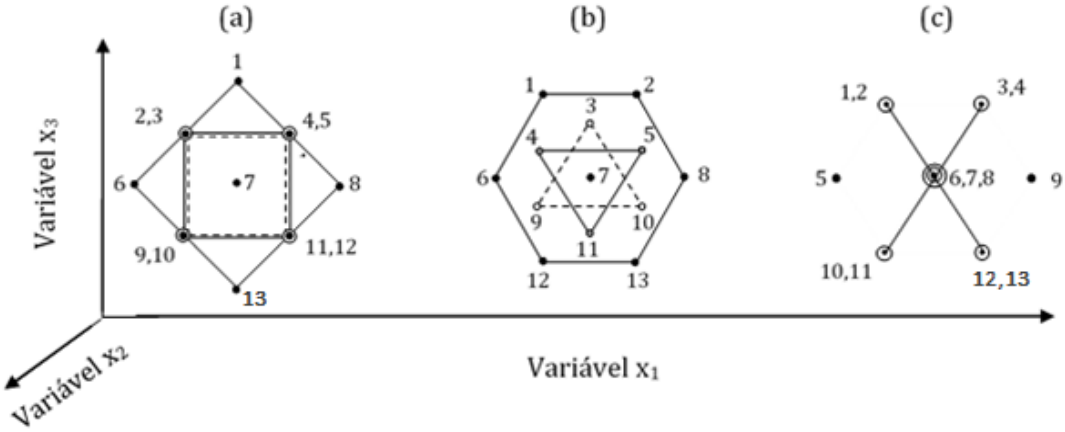


Figura 7 – Representação gráfica plana para as três diferentes projeções do planejamento Doehlert: (a) face quadrada; (b) face triangular e (c) sob o vértice



Para a otimização foi utilizado a solubilização alcalina empregando TMAH, 13 experimentos foram montados (realizados em duplicatas) para encontrar as melhores condições experimentais para a dissolução das amostras de carnes de bode usando energia de ultrassom. Os experimentos foram realizados com a temperatura do banho fixa em torno de 50 ºC. Nesse planejamento foram consideradas as seguintes variáveis: volume de TMAH, tempo de sonicação e massa da amostra (Tabela 6).

Tabela 6 – Matriz de Doehlert para o planejamento experimental

Experimento	V TMAH (µL)	MA (g)	TS (min)
1	1000	0,3	10
2	800	0,2	5
3	800	0,2	15
4	800	0,4	5
5	800	0,4	15
6	600	0,1	10
7	600	0,3	10
8	600	0,5	10
9	400	0,2	5
10	400	0,2	15
11	400	0,2	15
12	400	0,4	5
13	200	0,3	10

V:volume; **MA:** massa da amostra; **TS:** tempo de sonicação

A amostra devidamente pesada com massas variando entre 0,1 e 0,5g foi inserida em tubos de ensaio juntamente com o reagente (TMAH) sendo adicionado de acordo com o experimento proposto, utilizando o banho ultrassônico para a solubilização da amostra. No final do processo, o volume foi ajustado para 10.0 mL com água deionizada. As análises foram realizadas por espectrometria de absorção e emissão atômica com chama, a fim de identificar as melhores condições para realizar as demais determinações presente nesse trabalho.

4.7 Avaliação da exatidão para o procedimento proposto

A exatidão do procedimento proposto foi avaliada através da análise de CRM com característica semelhante à amostra. Foi utilizado amostra certificada NIST 1577b Bolive liver que passou pelos mesmos tratamentos das amostras.

O método proposto foi avaliado também através de teste de adição e recuperação. O teste foi constituído da adição de concentrações conhecidas de Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Na e K às amostras após os procedimentos de decomposição ou solubilização, logo após foi realizada a avaliação da recuperação dos mesmos. A escolha das concentrações adicionadas foi baseada nas concentrações que já haviam sido determinadas nas amostras e o limite de detecção da técnica utilizada.

4.8 Análise estatística

O pacote estatístico do software Statistica 10.0 foi utilizado para a realização e avaliação dos experimentos que utilizaram otimização quimiométrica por planejamento fatorial e matriz Doehlert, o Excel 2013 na obtenção de parâmetros estatísticos básicos, gráficos e obtenção das curvas analíticas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização multivariada do método analítico proposto

Os planejamentos multivariados proporcionam estratégias para otimização dos métodos analíticos melhorando os resultados obtidos e têm apresentado diversas vantagens como a redução do número de experimentos, consequentemente redução de tempo e consumo de reagentes. Outra vantagem muito interessante para otimizações multivariadas é a possibilidade de avaliar os possíveis efeitos de interação entre as variáveis estudadas.

5.1.2 Planejamento fatorial de dois níveis

No geral os planejamentos fatoriais de dois níveis são utilizados em investigações preliminares, quando o objetivo é apenas identificar se determinado fator possui ou não alguma influência sobre a resposta desejada. Neste momento ainda não se tem interesse em descrever detalhes sobre essa influência, e sim identificá-la [83].

Para que seja possível o estudo do efeito de uma determinada variável sobre a resposta, é preciso fazer com que esse fator varie e essa variação seja observada, implicando na realização de ensaio de ao menos dois níveis dessa variável. Sendo este o principal objetivo da utilização de um planejamento fatorial, que é estudar a influência de fatores e efeitos de interação sobre a resposta. A adição de pontos centrais ao planejamento traz algumas vantagens como a possibilidade de avaliar se os dados apresentam curvatura e de estimar o erro experimental sem ser preciso replicar o planejamento completo [84].

Neste trabalho foi utilizado o planejamento fatorial 2^4 objetivando investigar de forma preliminar a influência das variáveis no processo de solubilização da carne de bode utilizando TMAH. A partir da matriz do planejamento fatorial mostrado na Tabela 7, foi gerado o gráfico de Pareto, onde os fatores significados são evidenciados.

.

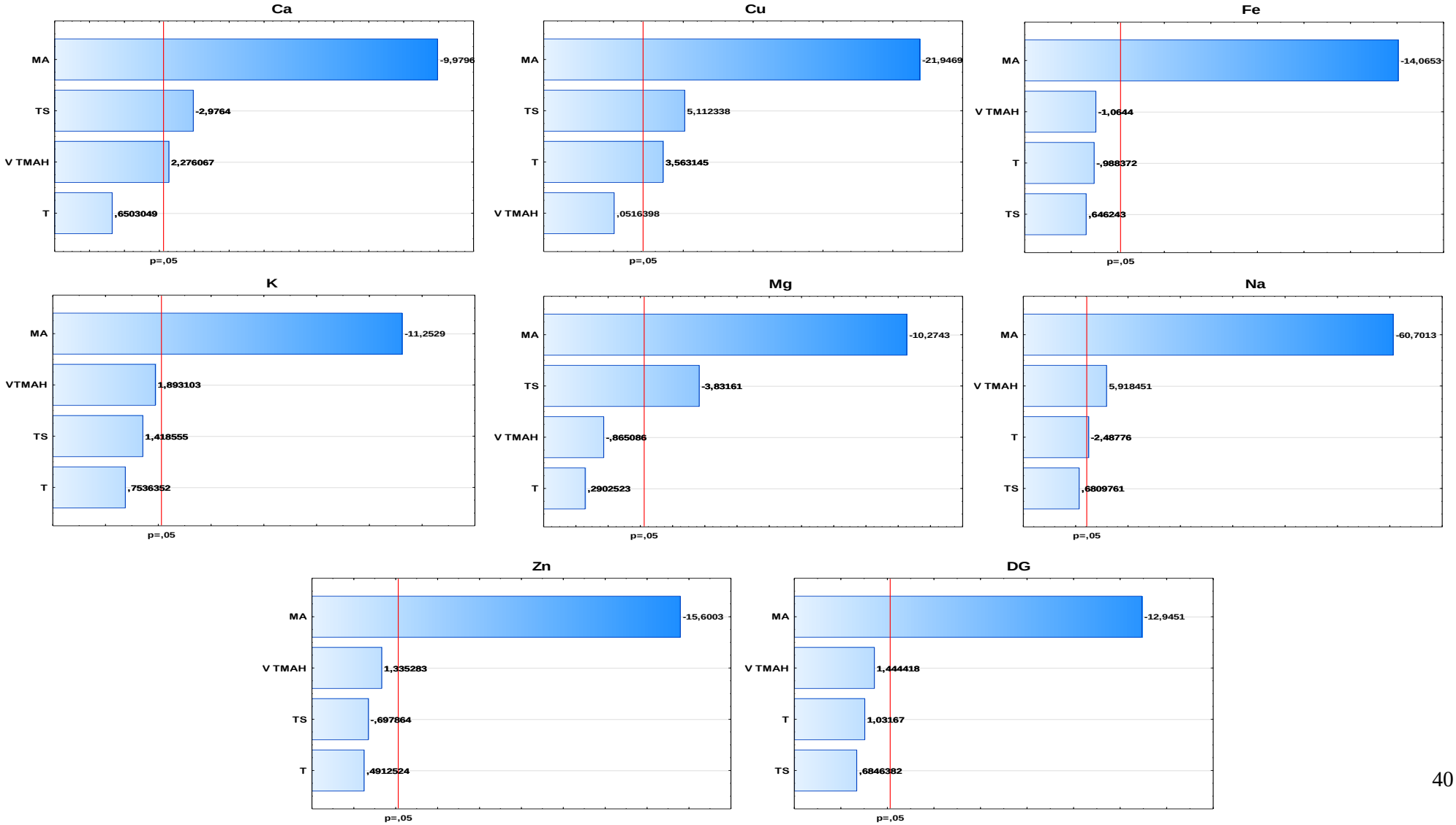
Tabela 7 – Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn em amostra de carnes de bode

Exp.	Massa da amostra (g)	Volume de TMAH (µL)	Tempo de sonicação (min)	Temperatura (ºC)	**Absorvância ou sinal de emissão**							**DG**
					Ca	**Cu**	**Fe**	**K**	**Mg**	**Na**	**Zn**	
1	0,1	200	5	25	0,011	0,005	0,018	160000	0.755	3752	0,285	0
					0,012	0,006	0,014	152779	0.666	3744	0,270	0,5799
2	0,5	200	5	25	0,012	0,005	0,012	129231	0,404	3227	0,106	0
					0,016	0,005	0,021	193409	1,204	4586	0,265	0
3	0,1	1000	5	25	0,018	0,004	0,016	153020	1,564	3989	0,270	0,6928
					0,013	0,006	0,015	157686	1,014	4188	0,240	0,6547
4	0,5	1000	5	25	0,013	0,009	0,024	197894	1,618	4929	0,392	0,1145
					0,015	0,007	0,026	261009	0,633	6513	0,454	0,1117
5	0,1	200	15	25	0,013	0,007	0,021	155525	0,453	3994	0,248	0,626
					0,010	0,008	0,013	156482	1,040	3947	0,238	0,6375
6	0,5	200	15	25	0,015	0,007	0,027	238984	1,419	6184	0,430	0,1245
					0,012	0,008	0,022	221471	1,548	5653	0,298	0,1064
7	0,1	1000	15	25	0,013	0,008	0,016	153090	0,722	4113	0,247	0,6581
					0,016	0,007	0,014	155494	0,325	4156	0,238	0,5736
8	0,5	1000	15	25	0,012	0,009	0,025	274005	0,690	7020	0,571	0,1267
					0,010	0,008	0,024	254229	0,525	6031	0,503	0,1001
9	0,1	200	5	50	0,009	0,007	0,016	137327	1,319	3656	0,367	0,6799
					0,011	0,005	0,014	141010	1,051	3694	0,229	0,5858

Exp.	Massa da amostra (g)	Volume de TMAH (µL)	Tempo de sonicação (min)	Temperatura (ºC)	**Absorvância ou sinal de emissão**							**DG**
					Ca	**Cu**	**Fe**	**K**	**Mg**	**Na**	**Zn**	
10	0,5	200	5	50	0,029	0,008	0,031	194510	1,665	4818	0,331	0,1315
					0,034	0,007	0,028	176126	1,420	4222	0,285	0,1070
11	0,1	1000	5	50	0,035	0,008	0,010	163953	1,232	4305	0,229	0,7658
					0,021	0,007	0,013	148025	1,122	3835	0,323	0,7309
12	0,5	1000	5	50	0,006	0,009	0,029	275945	0,182	7082	0,500	0,0517
					0,005	0,008	0,022	261887	0,170	6596	0,342	0
13	0,1	200	15	50	0,008	0,010	0,013	152319	0,597	3672	0,219	0,5695
					0,007	0,009	0,013	152391	0,567	3563	0,223	0,5423
14	0,5	200	15	50	0,024	0,013	0,037	212304	1,873	4874	0,385	0,1640
					0,023	0,009	0,030	188519	1,815	4577	0,320	0,1273
15	0,1	1000	15	50	0,006	0,007	0,012	148805	0,458	3653	0,247	0,4920
					0,009	0,008	0,014	146627	0,478	3651	0,231	0,5491
16	0,5	1000	15	50	0,012	0,011	0,031	264373	0,692	6024	0,524	0,1328
					0,009	0,012	0,031	269767	0,232	6160	0,619	0,0962

DG: Desejabilidade Global

Figura 8 – Gráficos de Pareto obtidos a partir dos dados do planejamento fatorial 2^4 mostrando os valores padronizados e a significância de cada variável



O uso do planejamento fatorial de dois níveis permitiu verificar as possíveis interações entre as variáveis, além de possibilitar a redução do trabalho laboratorial, gerando informações relevantes para o mapeamento dos fatores que poderiam afetar o sistema, na Figura 6 podem ser observados esses comportamentos.

A aplicação de função de desejabilidade possibilita combinar todas as respostas em uma única, e isso permite estudar simultaneamente os sete analitos. Porém, isso pode acabar em algumas situações limitando ou camuflando os reais resultados para cada analito. Diante disso, para este estudo dentro do intervalo estabelecido, as tendências das variáveis foram avaliadas individualmente para cada metal estudado.

Os gráficos de Pareto obtidos permitem observar que algumas variáveis apresentaram tendência a serem significativas quando analisados individualmente para cada metal. A temperatura foi uma variável que apresentou ser significativa apenas para o elemento Cu e levemente para o Na. Para a solubilização dos demais elementos estudados, essa variável não foi significativa. Portanto, analisando essa tendência a temperatura não foi considerada importante para o desenvolvimento do procedimento proposto dentro do intervalo estabelecido e, dessa forma foi fixada a temperatura de 50 ºC.

A massa da amostra apresentou efeitos significativos para solubilização de todos os analitos, com isso para essa variável juntamente com o volume de TMAH e tempo de sonicação, foram realizados estudos mais detalhados, usando o planejamento Doehlert buscando os valores ótimos referente a cada variável.

5.1.3 Planejamento Doehlert

Entre as variáveis que podem exercer influência de forma independente ou interagindo com outros fatores as variáveis investigadas foram tempo de sonicação da amostra, volume de TMAH e massa da amostra. Considerando que a variável temperatura, como visto anteriormente no planejamento fatorial, não foi significativa no processo de solubilização da amostra, foi fixada em 50ºC.

Foi utilizado um planejamento Doehlert para três variáveis, através da projeção de um sólido geométrico (cubo octaedro) no plano apresentando uma projeção sob a face quadrada envolvendo os 13 experimentos. De acordo com as características da Matriz Doehlert citadas

acima, as variáveis volume de TMAH (200 - 1000 µL) e massa da amostra (0,1 - 0,5g) foram estudadas em cinco níveis, e a variável tempo de sonicação (5 - 15 min) foi estudada em três níveis. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas com replicatas no ponto central.

O planejamento Doehlert possibilitou investigar as influências dos fatores no processo da determinação de metais em carne de bode, obtendo assim as melhores condições experimentais para a realização efetiva do procedimento (Tabela 8).

Tabela 8 – Matriz do planejamento Doehlert para a otimização das variáveis que influenciaram no procedimento de solubilização da amostra de carnes de bode

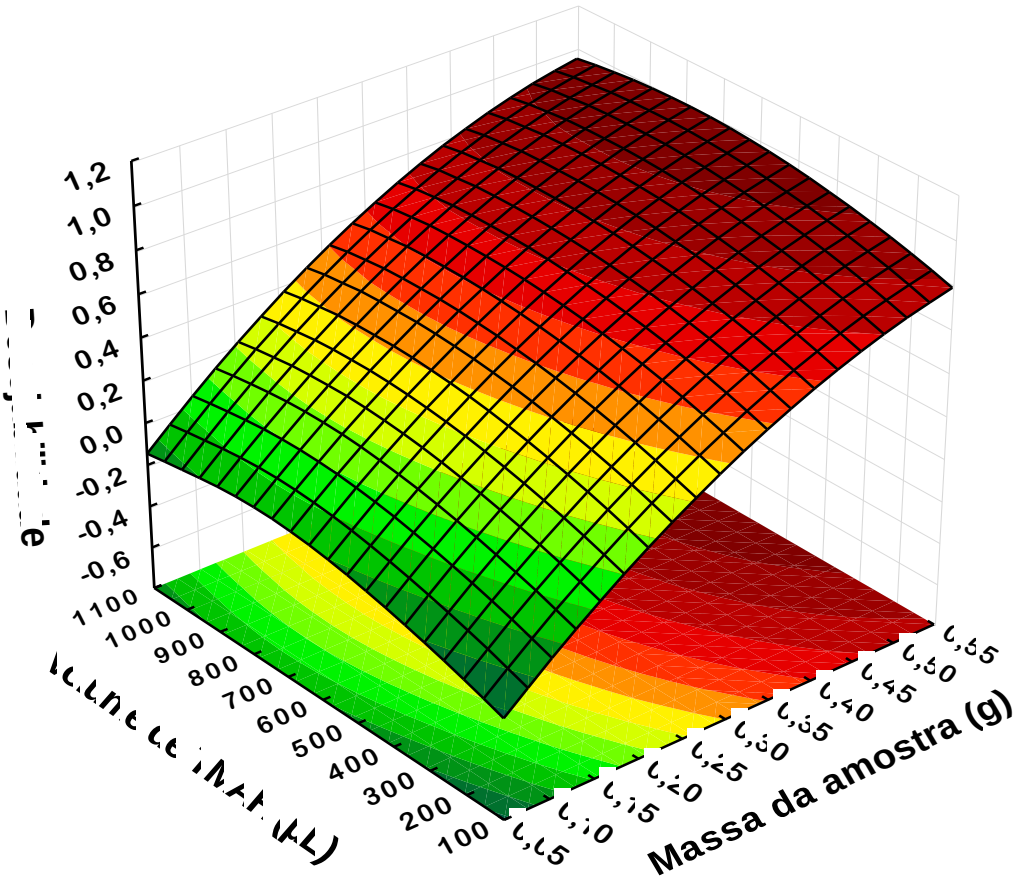
Exp.	Massa da amostra (g)	Volume de TMAH (µL)	Tempo de sonicação (min)	**Absorvância ou sinal de emissão**							**DG**
				Ca	**Cu**	**Fe**	**K**	**Mg**	**Na**	**Zn**	
1	0,3	1000	10	0,160	0,014	0,055	457702	0.176	76413	0,708	0,636532
				0,150	0,014	0,053	470050	0.168	83229	0,732	0,641102
2	0,2	800	5	0,120	0,010	0,032	324878	0,130	72425	0,550	0,326004
				0,110	0,012	0,036	332250	0,134	69124	0,507	0,327984
3	0,2	800	15	0,130	0,010	0,032	355344	0,124	67986	0,578	0,344511
				0,110	0,010	0,033	347882	0,127	71128	0,564	0,319103
4	0,4	800	5	0,150	0,018	0,053	442235	0,148	85834	0,846	0,673903
				0,170	0,016	0,050	436712	0,150	84613	0,863	0,675189
5	0,4	800	10	0,230	0,018	0,068	478238	0,166	96210	1,121	0,927887
				0,220	0,020	0,060	464530	0,193	90179	0,879	0,878154
6	0,1	600	10	0,090	0,008	0,017	267512	0,084	51030	0,306	0
				0,100	0,006	0,018	243061	0,073	49450	0,305	0
7	0,3	600	10	0,160	0,016	0,047	428415	0,163	74985	0,735	0,611186
				0,180	0,014	0,050	428276	0,133	75792	0,725	0,587628
8	0,5	600	5	0,240	0,020	0,061	481493	0,206	91352	1,167	0,981352
				0,220	0,020	0,065	488407	0,191	93220	0,904	0,917947
9	0,2	400	15	0,120	0,010	0,030	316416	0,087	65562	0,490	0,234975
				0,120	0,008	0,027	329218	0,077	63850	0,476	0,170665

Exp.	Massa da amostra (g)	Volume de TMAH (µL)	Tempo de sonicação (min)	**Absorvância ou sinal de emissão**							**DG**
				Ca	**Cu**	**Fe**	**K**	**Mg**	**Na**	**Zn**	
10	0,2	400	5	0,150	0,012	0,034	343231	0,108	65630	0,536	0,351594
				0,160	0,010	0,038	336225	0,112	66928	0,516	0,350704
11	0,4	400	15	0,170	0,014	0,046	439237	0,152	82672	0,750	0,620008
				0,180	0,016	0,048	429478	0,142	83452	0,702	0,631659
12	0,4	400	10	0,190	0,018	0,052	467230	0,177	83865	0,728	0,736956
				0,210	0,016	0,059	455479	0,170	84317	0,674	0,730173
13	0,3	200	15	0,130	0,012	0,042	350978	0,115	67046	0,601	0,381359
				0,120	0,010	0,038	343283	0,116	67983	0,572	0,332051

DG: Desejabilidade Global

Funções matemáticas quadráticas foram ajustadas à função de desejabilidade usando-se regressão por mínimos quadrados. Através do programa computacional estatístico foi possível obter as superfícies que ilustram o comportamento das respostas à medida que os níveis dos fatores em estudo são alterados (Figuras 9 a 11).

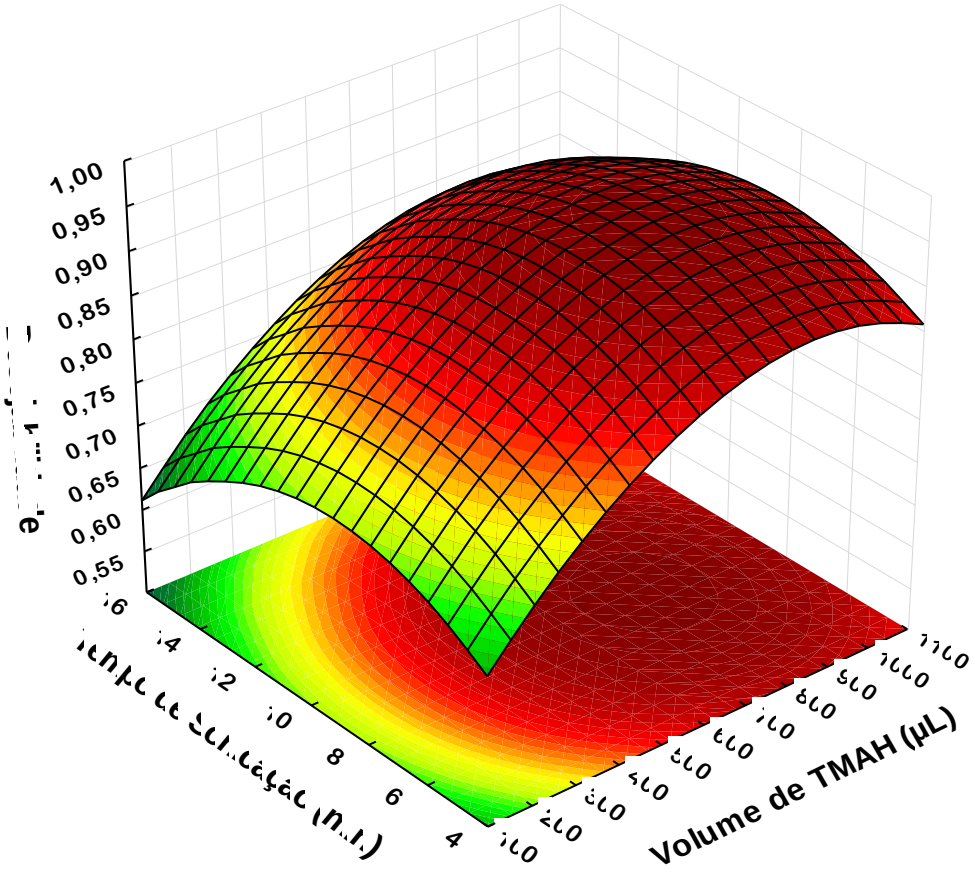
Figura 9 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados das variáveis massa da amostra e volume de TMAH



A Figura 9 ilustra a interação entre o volume de TMAH e a massa da amostra obtida através do planejamento Doehlert. Teoricamente quando maior a massa maiores serão os valores de concentrações e consequentemente serão necessários maiores volumes de TMAH para sua dissolução. As massas foram avaliadas entre 0,1 a 0,5g de amostra liofilizada, e os volumes de TMAH entre 200 e 1000 µL. Na literatura encontram-se trabalhos com diferentes proporções de massas e volumes do reagente solubilizante. Torres e *colaboradores* relataram que foram precisos 5 µL de TMAH para cada mg de amostra de rim suíno e fígado de peixe

[85]. Há procedimentos na literatura citando a utilização de 1000 uL de TMAH para 75 mg de amostra [69]. Entretanto, neste trabalho, nas condições estudadas, observou-se que em torno de 2 µL de TMAH 25% (m/v) por mg de amostra de carne de bode liofilizada foram suficientes para a completa solubilização (1000 µL de TMAH para 500 mg de amostra), considerando que a massa otimizada foi de 0,5g de amostra.

Figura 10 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados das variáveis tempo de sonicação e volume de TMAH



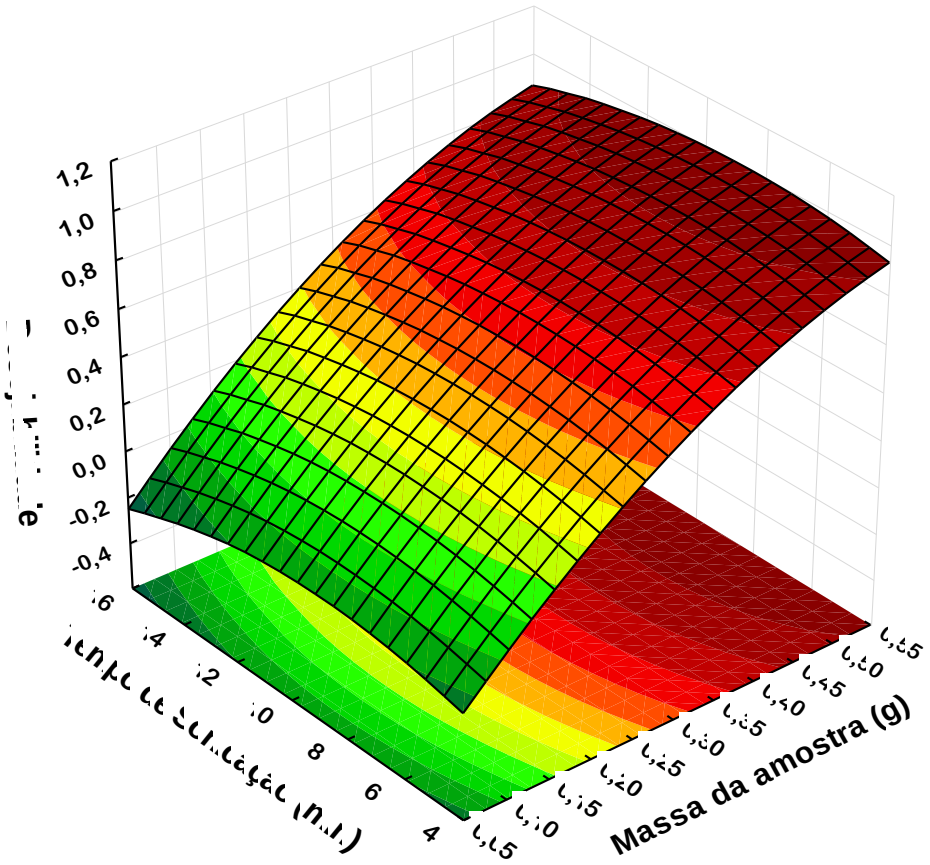
A variável tempo de sonicação é caracterizada pelo período em que a amostra fica submetida à incidência de ondas ultrassônicas na presença do reagente que promoverá a diluição. É uma variável que poderá exercer influência bastante significativas, pois teoricamente quanto maior o tempo de exposição ao banho ultrassônico, mais efetiva seria a diluição. No entanto, num determinado tempo não é mais notado um aumento considerável no desempenho da diluição, propondo limites ao expor amostras a esse tipo de energia. Interessante é que pequenos períodos possam proporcionar eficiência na solubilização e evitar desta forma, perdas de analitos por adsorção nas paredes de recipientes utilizados, riscos de

contaminação por exposição à atmosfera e que o procedimento demandem muito tempo. O tempo adotado no procedimento proposto foi de aproximadamente 8 vezes menor que o tempo requerido para decomposição das amostras por via úmida em bloco digestor.

O volume da solução de Hidróxido de Tetrametilamônio possui a função de auxiliar na solubilização de proteínas. A quantidade de TMAH para o processo de solubilização, dependerá do tipo de matriz dentro de uma faixa de variação que seja considerada eficiente e adequada para os componentes presentes na amostra. Sendo assim, quantidades muito pequenas podem não ser totalmente efetivas por não ser proporcional a quantidade de proteínas e gorduras que possam estar presentes na matriz.

De acordo com a superfície ilustrada na Figura 10 e os perfis de desejabilidades que serão discutidos a seguir, o volume de TMAH ótimo encontrado para a solubilização das amostras no tempo de aproximadamente 12 minutos foi de 1000 µL.

Figura 11 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados das variáveis tempo de sonicação e massa da amostra



A resposta desejada na superfície da Figura 11 está localizada na região de máximo caracterizada pela coloração de vermelho mais intenso, complementando as outras duas superfícies vistas anteriormente indicando a massa de 0,5 g de amostra e em torno de 12 minutos para o tempo de sonicação no banho ultrassônico.

A equação que é gerada através do ajuste de um modelo quadrático descreve o comportamento dos dados experimentais. Após a derivação é obtido o valor crítico como resposta global em termos de desejabilidade. Esse comportamento é descrito pela seguinte equação que é fornecida pela planilha eletrônica:

$$D = 0{,}00223 + 2{,}18\ m - 0{,}876\ (m)^2 - 0{,}000598\ (\text{Vol. de TMAH}) - 0{,}00532\ (TS) - 0{,}00236\ (TS)^2 + 0{,}000563\ (m)\ (TMAH) + 0{,}0495\ (m)\ (TS) + 0{,}000059\ (TMAH)(TS)$$

Esses valores são as coordenadas que indicam as proporções dos componentes que geram a maior resposta para o sistema, no método proposto essas condições foram: 0,5g de amostra, aproximadamente 12 minutos para o tempo de sonicação e 1000µL para o volume de TMAH.

5.1.4 Perfis de desejabilididades para os metais estudados

Para análise dos dados foi utilizado o método proposto por Derringer e Suich [86], que emprega a otimização multivariada utilizando uma função multi-resposta com base no conceito de desejabilidade e transformações do tipo exponencial. Para essas transformações é preciso de um valor mínimo e um valor máximo que sejam aceitáveis para cada resposta e certos parâmetros específicos para que estas transformações expressem a desejabilidade requerida. Desta forma, para que uma função maximize uma resposta, deve-se assumir que exista um valor alvo para ela, acima do qual, as condições estabelecidas estejam totalmente satisfeitas e também abaixo do qual o resultado não deva ser aceitável.

Primeiramente, cada resposta é convertida em uma desejabilidade individual d*i*, que varia entre 0 e 1, sendo um o valor desejável e zero o valor rejeitável. Os cálculos são obtidos através da Equação 01, onde *y* será a resposta analisada, *L* a menor resposta obtida e T que será o valor alvo.

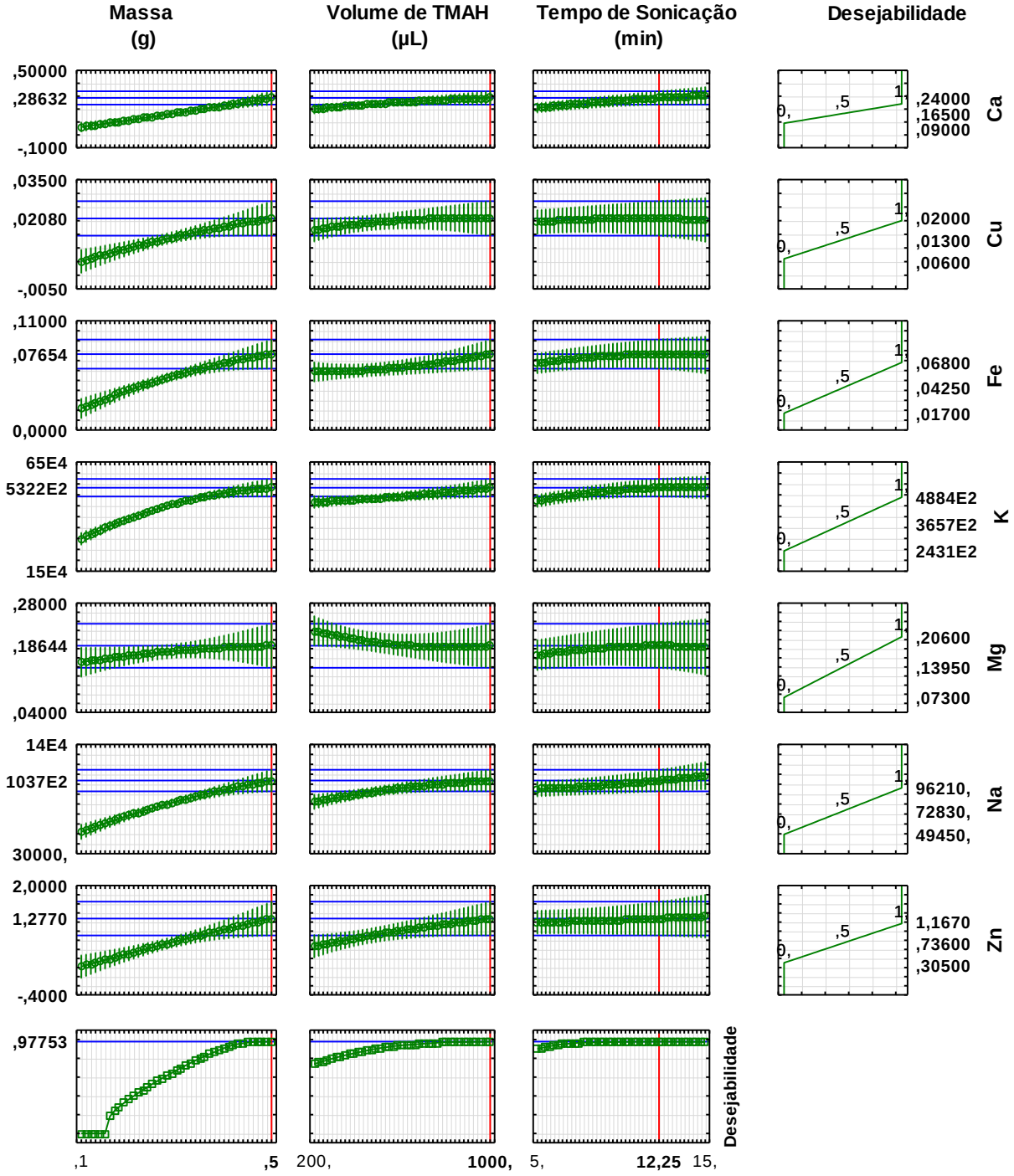
$$d=\begin{cases} 0 \; se \; y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^{s} \; se \; L \leq y \leq T \\ 1 \; se \; y > T \end{cases} \qquad \textbf{(Equação 01)}$$

Os cálculos das desejabilidades individuais foram combinados em desejabilidade global, que pode ser obtida por meio da média geométrica das desejabilidades individuais, conforme expresso na Equação 02.

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 ... d_m} \qquad \textbf{(Equação 02)}$$

A partir da função desejabilidade é possível analisar simultaneamente as sete respostas referente às absorvâncias e sinais de emissão dos metais em estudo. Na Figura 12 encontra-se os perfis de desejabilidade que foram gerados com os dados obtidos experimentalmente. As respostas individuais de cada metal estão variando de acordo com a mudança de nível de cada variável. Com a análise da superfície de resposta e dos gráficos de perfis de desejabilidade que foram gerados, pode-se verificar condições otimizadas para obtenção dos metais estudados na amostra de carnes de bode.

Figura 12 – Perfis das desejabilidades individuais para Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn e perfil de desejabilidade global



A obtenção dos valores ótimos para os parâmetros investigados foram realizados pela metodologia de determinação simultânea, empregando a função de desejabilidade.

Os valores ótimos indicados pela desejabilidade global para cada metal são representados individualmente nos sete primeiros gráficos que estão indicados pelas linhas tracejadas em vermelha na vertical, ou seja, são essas as condições experimentais adequadas para se obter as melhores respostas de todos os analitos estudados simultaneamente. Com base nos perfis de desejabilidade e matriz Doehlert, encontrou-se como valores ótimos para tempo de sonicação, volume de TMAH e massa da amostra respectivamente os valores 12,25 minutos, e 1000 microlitros e 0,5g. O tempo de sonicação apresentou pouca variação dentro de um determinado intervalo, demonstrando ser uma resposta robusta, diante disso, foi adotado como valor ótimo 15 minutos garantindo assim a eficiência do procedimento.

A desejabilidade global para as condições otimizadas foi de 0,9775, sendo este valor excelente pois a literatura recomenda que quanto mais próximo de 1 for, mais adequadas e satisfatórias serão as condições para a solubilização simultânea de todos os analitos requeridos.

5.2 Avaliação do modelo proposto

A Tabela 9 descreve a análise de variância para a aplicação do modelo quadrático para o planejamento Doehlert que foi apresentado anteriormente. Foi utilizado o teste F para a significância estatística da regressão, o qual obteve-se o valor de 91,01 para 9 e 16 graus de liberdade. Em um nível de confiança 95% o valor de F corresponde a 2,055, sendo este valor inferior ao valor calculado, indicando desta forma que o modelo matemático descreve de modo adequado o comportamento dos dados experimentais. Para o teste da falta de ajuste, em um nível de confiança de 95% o valor calculado foi 17,09, que por sua vez apresentou-se maior que 2,560 para 3 e 13 graus de liberdade. Diante disso, verifica-se, que o modelo apresenta falta de ajuste significativa. Mesmo assim, o resultado obtido é utilizado na aplicação do método estudado, uma vez que indica as tendências experimentais para obter as melhores condições no processo de solubilização das amostras.

Tabela 9 – Análise de variância para o modelo quadrático ajustado à resposta combinada das absorvâncias e sinais de emissão dos sete metais estudados em nível de confiança de 95%

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calc	F tab
Regressão	1,833	9	0,2036	91,01	2,055
Resíduos	0,03580	16	0,002237		
Falta de ajuste	0,02856	3	0,009522	17,09	2,560
Erro puro	0,007235	13	0,000557		
Total	1,869	25			

SQ: soma quadrática; **GL:** grau de liberdade; **MQ:** média quadrática

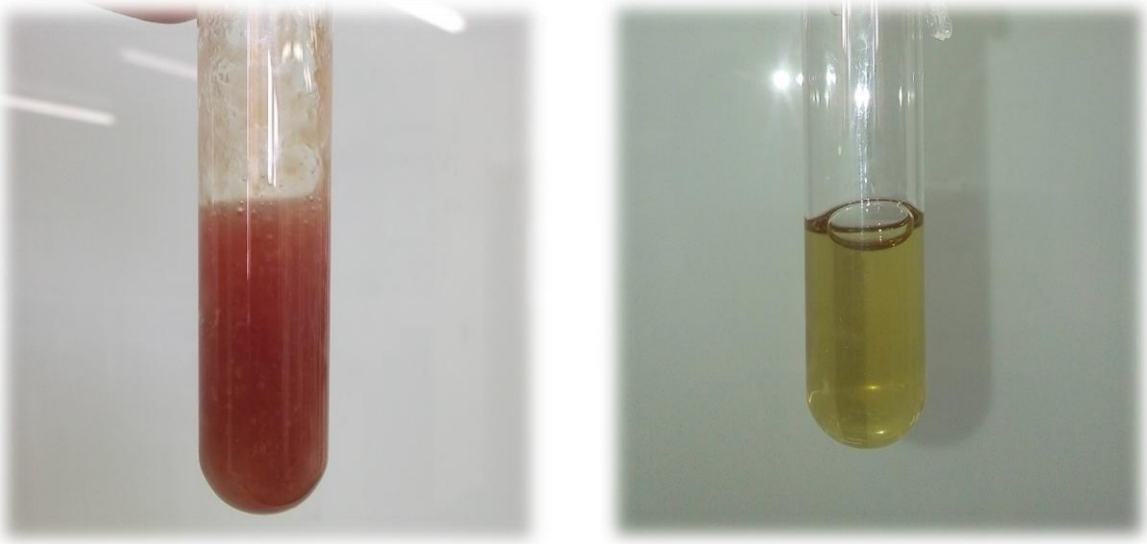
5.2.1 Determinação dos analitos em carnes de bode aplicando o método de preparo de amostra otimizado

5.2.3 Preparo de amostra por solubilização com TMAH

O método de solubilização com TMAH foi proposto nesse trabalho por ser considerado de baixo custo, simples, rápido, os procedimentos podem ser realizados sem aquecimentos ou usando temperaturas brandas, além de reduzir os riscos de contaminação ou perdas. A partir disso, investigou-se a aplicabilidade desse método por meio de amostra de carne de bode liofilizada, e diferentes parâmetros como, tempo de sonicação no banho ultrassônico, volume de TMAH e massa da amostra foram avaliados.

Em relação a solubilização das amostras foi observado maiores intensidades de coloração a medida em que aumentava-se a massa, como esperado. Os tubos foram colocados individualmente na região central da cuba ultrassônica para garantir a máxima eficiência do equipamento, uma vez que uma das limitações relatadas na literatura sobre o banho ultrassom é a não homogeneidade de distribuição das ondas em seu interior. Na figura 13 encontra-se os aspectos visuais das amostras de carnes de bode, primeiro apenas com adição de água e do TMAH e em seguida após o tratamento do meio em banho ultrassônico.

Figura 13 – (a) Amostra após adição de água deionizada e TMAH antes da sonicação; (b) amostra após sonicação com TMAH



(a) **(b)**

Fonte: Acervo de fotos da autora

5.2.4 Ultrassom no tratamento das amostras de carne de bode

O uso do ultrassom promoveu a solubilização dos materiais em suspensão além de facilitar a determinação dos elementos. As ondas ultrassônicas transferem e localizam uma grande quantidade de energia em pontos específicos nas superfícies das partículas que proporcionará a sua quebra, desagregação e consequentemente permite uma solubilização mais eficiente.

Considerada uma vantajosa alternativa por ser de simples operação, e bastante eficiente na extração e solubilização de elementos em diversos tipos de amostras. Não sendo necessário o uso de altas temperaturas e pressões, diante disso esses procedimentos envolvendo a energia ultrassônica são relativamente rápidos.

5.2.5 Decomposição por via úmida em bloco digestor e “dedo frio”

Nessa etapa do procedimento foi utilizado o “dedo frio” que é constituído de um material de vidro e como o nome sugere, possui a forma de dedo. Este é acoplado no tubo de digestão e colocado água fria no seu interior para resfriar a parte superior do tubo, provocando refluxo e desta forma evitando a volatilização e consequentemente perdas de espécies.

Baixos valores de brancos foram obtidos nesse método e resultados satisfatórios foram encontrados. Levando em consideração que a decomposição por via úmida em sistemas abertos estão mais suscetíveis a contaminação em relação aos sistemas fechados, essa contaminação e/ou perdas foram minimizadas com a utilização de ‘dedo frio’ durante a decomposição da amostra. Os resultados encontrados foram utilizados como método comparativo para ao método proposto considerando os resultados eficientes que são relatados na literatura com a utilização desse método. No entanto apresenta algumas desvantagens como a utilização de ácidos concentrados, altas temperaturas e ser um procedimento que demanda mais tempo. Na tabela 15 encontra-se a comparação das concentrações obtidas utilizando a decomposição por via úmida em bloco digestor e a solubilização alcalina com TMAH.

5.3 Avaliação do efeito de matriz

Quando os componentes contidos na matriz de estudo podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse e que por sua vez podem gerar resultados duvidosos, tem-se efeito de matriz. A presença de alguns componentes em amostras que apresentam matrizes complexas, pode estar relacionada com as interferências, cuja reprodução na solução aquosa dos padrões de calibração e de seus brancos em algumas situações pode não ser possível.

A padronização por adição padrão é muito trabalhosa e requer muito tempo, esses experimentos foram realizados para avaliar também a possibilidade de se utilizar a padronização externa em meio aquoso. O artifício de equiparação da matriz foi utilizado, para isso uma solução aquosa do reagente TMAH foi necessária, considerando a não disponibilidade de uma amostra de carne sem a presença dos metais estudados.

Desta maneira, foram realizados três curvas analíticas: (1) curva aquosa: utilizando a técnica de padronização externa apenas com os metais e água deionizada; (2) curva com TMAH: utilizando a técnica de padronização externa com o reagente TMAH + metais e (3)

adição padrão: padronização utilizando a amostra de carne de bode após solubilização com TMAH em banho ultrassônico. Alíquotas adequadas dos analitos foram adicionadas à amostra solubilizada com TMAH, e as concentrações finais para as curvas foram equivalentes aos seguintes pontos das curvas analíticas: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0 mg L^{-1}.

A Figura 14 apresenta as curvas analíticas obtidas em solução aquosa, em solução com TMAH e na presença da amostra tratada com TMAH. A observação dos resultados indicam que em nenhum dos analitos estudados houveram sobreposição dessas curvas.

Analisando a Figura 14 e a Tabela 10, pode-se inferir que as inclinações das curvas aquosas para o Ca, Cu, Fe e Mg apresentaram-se estatisticamente semelhante a curva obtida com adição padrão da amostra. Por outro lado, as curvas obtidas por meio da padronização externa com o TMAH apresentaram inclinações pequenas.

Ao contrário do que aconteceu com os analitos citados acima, para o Na, K e Zn as curvas obtidas através da padronização externa com o TMAH e a curva por adição padrão apresentaram inclinações e intervalos de coeficientes estatisticamente significativos, porém a curva aquosa apresentou inclinação pequena comparada as outras duas estudadas. Para o Zn a curva por adição padrão foi diferente das curvas obtidas por meio da padronização externa, sendo assim similiar entre a curva aquosa e a curva com TMAH.

A Tabela 10 apresenta os parâmetros das curvas analíticas no nível de confiança de 95%. O comportamento do parâmetro intervalo do coeficiente angular permite avaliar se as inclinações das curvas analíticas são equivalentes e isso pode ser notado quando os intervalos possuírem interseção.

Esses estudos comprovam que para os metais Ca, Cu, Fe e Mg pode-se utilizar uma curva analítica por padronização externa na determinação desses metais nas amostras de carnes analisadas após solubilização com TMAH. Para o Na, K e Zn infelizmente, não se pode utilizar a padronização externa, sendo recomendado para esse analito a padronização por adição padrão considerando que as curvas obtidas por padronização externa não compensam o efeito de matriz.

Figura 14 Curvas analíticas obtidas em diferentes meios utilizando o artifício de equiparação da matriz

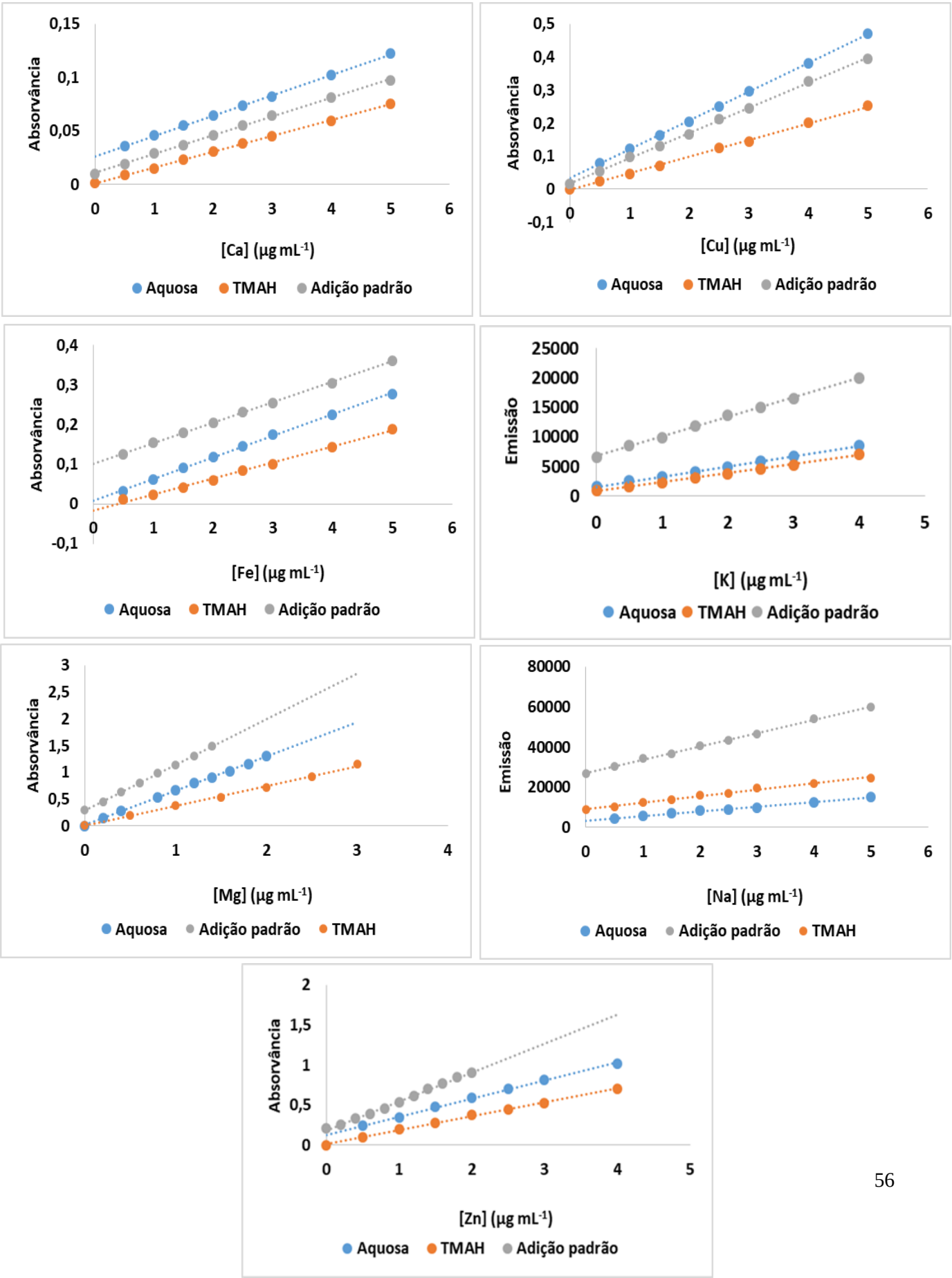


Tabela 10 – Parâmetros das curvas analíticas para o Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn obtidos nos meios aquoso, TMAH e adição padrão para as carnes analisadas

Analito	Meio	Técnica de calibração	Equação	IC* da inclinação	R^2
Ca	Aquoso	Pad. externo	y = 0,0189 x + 0,0264	51,57 – 53,93	0,9995
	TMAH	Pad. externo	y = 0,0147x + 0,0011	66,75 – 69,40	0,9995
	Carne + TMAH	Adição padrão	y = 0,0175x +0,0108	55,98 – 58,46	0,9994
Cu	Aquoso	Pad. externo	y =0,0871x + 0,0328	11,65 – 11,32	0,9998
	TMAH	Pad. externo	y =0,0505x + 0,0023	19,21 – 20,40	0,9991
	Carne + TMAH	Adição padrão	y = 0,0762x +0,0172	12,87 – 13,37	0,9995
Fe	Aquoso	Pad. externo	y = 0,0545x +0,008	17,75 – 18,90	0,9990
	TMAH	Pad. externo	y = 0,0399x +0,0157	23,22 – 26,62	0,9954
	Carne + TMAH	Adição padrão	y = 0,0516x +0,1016	18,92 – 19,85	0,9994
K	Aquoso	Pad. externo	y =1724x + 1576	0,000565 – 0,000594	0,9994
	TMAH	Pad. externo	y = 1532x +796,5	0,0000613 - 0,000688	0,9966
	Carne + TMAH	Adição padrão	y = 3322x + 6743	0,000289 – 0,000312	0,9986
Mg	Aquoso	Pad. externo	y =0,6388x + 0,0178	1,529 – 1,598	0,9993
	TMAH	Pad. externo	y =0,3712x + 0,0045	2,526 – 2,847	0,9973
	Carne + TMAH	Adição padrão	y = 0,8502x +0,0290	1,147 – 1,203	0,9994
Na	Aquoso	Pad. externo	y = 2282x +3402	0,000403 – 0,000469	0,9943
	TMAH	Pad. externo	y = 3176x +9266	0,000287 – 0,000337	0,9921
	Carne + TMAH	Adição padrão	y = 6647x +2701	0,000146 – 0,000155	0,9989
Zn	Aquoso	Pad. externo	y =0,2255x + 0,1324	4,214 – 4,638	0,9983
	TMAH	Pad. externo	y = 0,1742x +0,0171	5,502 – 5,962	0,9984
	Carne + TMAH	Adição padrão	y = 0,3596x + 0,1886	2,670 – 2,877	0,9975

5.4 Validação da metodologia proposta

A validação de uma metodologia pode ser realizada através de alguns parâmetros como linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Tais parâmetros são de grande importância para aferir se o método está realmente adequado para determinado uso.

5.4.1 Linearidade

Capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito nas amostras, isso em uma dada faixa de concentração. Para a quantificação é necessário conhecer a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito, demostrando desta maneira a eficiência e confiabilidade da metodologia em fornecer resultados diretamente proporcionais entre essas medidas [87].

Para que os resultados sejam considerados satisfatórios, inicialmente tem que ser possível notar uma linearidade aparente, em seguida o coeficiente de determinação será encontrado, sendo que para a ANVISA devem apresentar valores de R^2 igual ou superior a 0,99. Por outro lado, valores de R^2 superior a 0,90 são aceitos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) [88,89]. A linearidade do método foi avaliada através do efeito de matriz com experimentos realizados utilizando a padronização externa e adição padrão. Na Tabela 11 estão expressos os valores de R^2 para Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn adotando a padronização externa e para o Na adotando a padronização por adição padrão.

Tabela 11 – Linearidade das curvas analíticas

Padrão	R^2	Faixa de concentração (µg mL^{-1})
Ca	0,9995	0,5 – 5,0
Cu	0,9998	0,5 – 5,0
Fe	0,9990	0,5 – 5,0
Mg	0,9993	0,2 – 3,0
Na	0,9989	0,5 – 5,0
K	0,9994	0,5 – 4,0
Zn	0,9983	0,2 – 4,0

5.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LD)

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), o limite de detecção (LD) é calculado multiplicando por três o desvio padrão do sinal analítico obtido a partir de dez determinações do branco e dividindo-se esse valor pelo coeficiente angular da curva analítica (aqui simbolizado por b). O limite de detecção é o valor que determina a menor concentração de um analito, que pode ser medida em um determinado nível de confiança, conforme a Equação 3.

$$LD = \frac{3S_{Br}}{b} \qquad \textbf{(Equação 3)}$$

O limite de quantificação (LQ), definido como o nível acima do qual resultados quantitativos podem ser obtidos com um grau específico de confiança, pode ser calculado de forma semelhante ao LD, multiplicando dez vezes o desvio padrão do branco e dividindo-se pelo coeficiente angular da curva analítica (b), na Equação 4 encontra-se a fórmula utilizada.

$$LQ = \frac{10S_{Br}}{b} \qquad \textbf{(Equação 4)}$$

5.4.3 Precisão (RSD)

A precisão pode ser expressa como repetibilidade, sendo esta a concordância dos resultados individuais obtidos pelo mesmo método e sob as mesmas condições e por um período curto de tempo. Outra maneira de expressar a precisão é por meio da reprodutibilidade, que também indicará a concordância dos resultados individuais obtidos, porém sob diferentes condições [90].

No geral, a precisão indica o grau de incerteza de um resultado analítico e pode ser expressa através do desvio padrão relativo, quanto maior a dispersão dos valores, menor será a precisão. De acordo com a Equação 5, a precisão pode ser obtida pela divisão do desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S_c) pelo valor da média da concentração determinada (c).

$$\boldsymbol{RSD}\% = \left(\frac{Sc}{c}\right) x100 \qquad \textbf{(Equação 5)}$$

Os limites de detecção, quantificação e o desvio padrão relativo obtidos para o método proposto são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Limites de detecção, quantificação e desvio padrão relativo calculados para o método empregado

Analito	LD (µg g^{-1})	LQ (µg g^{-1})	RSD (%)	
			0,5 µg mL^{-1}	2,5 µg mL^{-1}
Ca	2,28	7,60	3,57	1,74
Cu	0,407	1,35	2,42	1,05
Fe	1,24	4,14	5,21	1,60
K	0,0752	0,251	0,353	0,103
Mg	0,0665	0,221	0,931	0,393
Na	0,191	0,638	0,462	0,0930
Zn	0,169	0,563	2,74	0,900

5.4.4 Avaliação da recuperação dos analitos e exatidão do método

5.4.4.1 Teste de adição recuperação

O teste de adição recuperação está relacionado com a exatidão, sendo expressa como erro sistemático percentual referente ao processo. É caracterizado por refletir a quantidade de um dado analito que foi recuperado no processo em relação a quantidade real presente na amostra. O ensaio de recuperação é o método mais utilizado para validação de processos analítico.

O princípio do método é baseado em fortificar a amostra, ou seja, a adição de uma quantidade conhecida de analito à amostra seguida pela determinação da concentração, testando se a resposta da amostra corresponde ao esperado. As análises das amostras fortificadas devem ser feitas da mesma maneira que as amostras desconhecidas. O critério de aceitação estabelecido neste método foi de acordo com os valores proposto pelo Standard Methods, sendo aceitáveis valores de recuperações dentro da faixa de 80% a 120% [91].

Calcula-se a quantidade percentual recuperada no processo através da fórmula:

$$\%\ \boldsymbol{recuperação} = \frac{\boldsymbol{C}\ amostra\ fortificada - \boldsymbol{C}\ amostra\ real}{\boldsymbol{C}\ adicionado}\ \boldsymbol{x100}$$

Outros componentes da própria matriz podem interferir na separação, detecção ou até mesmo na quantificação dos analitos, por isso a importância da realização do efeito de matriz. As recuperações dos metais adicionados nas amostras podem evidenciar quando o método desenvolvido não é afetado por efeitos de matriz, indicando sua aplicação satisfatoriamente para análises da amostra estudada.

Neste teste, as amostras de carnes de bode foram "enriquecidas" com adições de soluções contendo concentrações conhecidas de Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Na e K. As concentrações utilizadas para dopagem das amostras variaram entre 0,2 a 20 mg/L, sendo estas baseadas na quantificação realizada anteriormente das amostras e o limite de detecção da técnica utilizada. Todos os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Recuperação (%) de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn em amostras de carnes de bode

Analitos	**Origem das amostras**				
	Jaguaquara	**Jequié**	**Lagedo do Tabocal**	**Manoel Vitorino**	**Maracás**
Ca	104	114	94	84	122
Cu	98	85	94	105	96
Fe	96	118	92	86	84
K	89	101	106	104	101
Mg	90	110	98	95	120
Na	86	95	106	86	103
Zn	----	66	----	85	42

As recuperações obtidas dos analitos foram satisfatórias (84-122%), com exceção para o Zn que foram obtidas recuperações muito baixas, principalmente para as amostras coletadas nos municípios de Jaguaquara e Lagedo do Tabocal, requerendo estudos mais aprofundados para este analito. Sugere-se que a elevada massa de amostra (500 mg) tenha proporcionado uma recuperação insatisfatória para o Zn, mesmo não tendo apresentado partículas em suspensão. Contudo, as demais recuperações foram aceitáveis sendo superiores a 84%, indicando que o método é adequado para efetuar as quantificações desses analitos.

5.4.4.2 Material de referência certificado

Visando garantir a confiabilidade das medições analíticas, os materiais de referência certificados são as bases para verificação da exatidão. Essa avaliação foi realizada no procedimento de solubilização proposto com TMAH e banho ultrassônico utilizando o material de referência certificado de fígado bovino (Bovine Liver NIST 1577b) com características semelhantes às amostras. O CRM foi submetido aos mesmos tratamentos das amostras, mantendo-se a mesma proporção de massa de amostra, tempo de sonicação e volume de TMAH empregado para as amostras de carnes liofilizadas. Além disso, o CRM também foi tratado com ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio em bloco digestor, sendo utilizado como um método de referência. Os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn em material de referência certificado tratado com TMAH e com digestão ácida

Analitos	Valor certificado (µg g^{-1})	Valor encontrado (TMAH)	Valor encontrado (Ácida)
Ca	116 ± 4	114 ± 0,0076	101 ± 0,034
Cu	160 ± 8	135 ± 0,0016	141 ± 0,0015
Fe	184 ±1,5	143 ± 0,0012	169 ± 0,0031
K	0,994 ±0,002	0,965 ± 0,0042	0,893 ± 0,0060
Mg	601 ± 28	565 ± 0,0042	643 ± 0,018
Na	0,242 ± 0,006	0,332 ± 0,0063	0,374 ± 0,0055
Zn	127 ± 16	159 ± 0,00060	167 ± 0,00089

Para todos os elementos estudados, houveram concordâncias com os valores certificados, para isso foi aplicado o teste t pareado comparando os valores certificados e aqueles encontrados do CRM tratado com TMAH (t calculado 1,06 e t crítico 2,44) e com digestão ácida (t calculado 0,48 e t crítico 2,44). Estatisticamente em um nível de confiança de 95% não houveram diferenças significativas para os valores encontrados experimentalmente em carnes de bode para ambos os métodos comparados com os valores certificados.

Estes resultados indicam que o método proposto pode ser utilizado para posterior determinação dos elementos estudados em carnes de bode utilizando a espectrometria de absorção atômica com chama.

5.4 Comparação entre as concentrações dos analitos utilizando solubilização alcalina e decomposição por via úmida em bloco digestor e "dedo frio"

5.4.1 Aplicação da metodologia em amostras de carnes de bode

Objetivando avaliar a eficiência da solubilização alcalina comparada com a decomposição por via úmida em bloco digestor acoplado de "dedo frio", o método desenvolvido foi aplicado para determinação dos metais em estudo para outras amostras de carnes de bode adquiridas em alguns açougues localizados em municípios da região do Sudoeste da Bahia. Além da amostra representativa obtida em Jequié, amostras de Maracás-Ba, Jaguaquara-Ba, Manoel Vitorino-Ba e Lagedo do Tabocal-Ba, foram avaliadas por ambas as metodologias, diante disso, após a liofilização as condições otimizadas anteriormente foram aplicadas, os experimentos foram realizados em duplicatas. Os teores encontrados nas amostras estudadas confirmam que a carne de bode é uma fonte valiosa de alguns minerais essenciais, sendo estes necessários para o bom funcionamento do corpo humano.

Todos os resultados estão apresentados na Tabela 15 e demostram bastante similaridades entre si. Através do teste t pareado foi possível avaliar se os dados são iguais estatisticamente num nível de confiança de 95%.

Tabela 15 – Comparação entre as concentrações dos analitos (mg g^{-1}) utilizando solubilização alcalina e decomposição por via úmida em bloco digestor

Analito	Procedimento	Municípios				
		Jaguaquara	**Jequié**	**Lagedo do Tabocal**	**Manoel Vitorino**	**Maracás**
Ca	TMAH	0,1498 ± 0,0058	0,1646 ± 0,0142	0,1198 ± 0,00541	0,1586 ± 0,0118	0,09971 ± 0,00807
	Ácida	0,2099 ± 0,0120	0,1811 ± 0,00808	0,1498 ± 0,0120	0,1150 ± 0,0074	0,1150 ± 0,00734
Cu ($x10^{-3}$)	TMAH	5,213 ± 0,423	4,423 ± 0,683	2,451 ± 0,395	1,530 ± 0,455	5,080 ± 0,456
	Ácida	4,291 ± 0,455	5,475 ± 0,455	3,239 ± 0,684	1,924 ± 0,227	3,897 ± 0,228
Fe	TMAH	0,1823 ± 0,0125	0,1928 ± 0,0194	0,1537 ± 0,00719	0,1802 ± 0,00823	0,1264 ± 0,00529
	Ácida	0,1410 ± 0,00665	0,1728 ± 0,0104	0,1295 ± 0,00265	0,1185 ± 0,00412	0,1464 ± 0,00679
K	TMAH	1,497 ± 0,0677	1,338 ± 0,0106	1,184 ± 0,0115	1,314 ± 0,00993	1,405 ± 0,000711
	Ácida	1,357 ± 0,00200	1,198 ± 0,00680	1,162 ± 0,00215	1,111 ± 0,00430	1,136 ± 0,0487
Mg	TMAH	0,4515 ± 0,00965	0,4816 ± 0,0242	0,4120 ± 0,0301	0,4505 ± 0,00945	0,4881 ± 0,0306
	Ácida	0,4988 ± 0,0127	0,5722 ± 0,00713	0,5199 ± 0,0148	0,5061 ± 0,00582	0,5267 ± 0,0105
Na	TMAH	0,1572 ± 0,00487	0,2074 ± 0,00290	0,1689 ± 0,00576	0,1787 ± 0,00216	0,1660 ± 0,000946
	Ácida	0,1922 ± 0,00201	0,2133 ± 0,00720	0,2883 ± 0,00182	0,2327 ± 0,0387	0,1767 ± 0,00507
Zn	TMAH	0,2199 ± 0,00204	0,1670 ± 0,00153	0,2061 ± 0,00256	0,1387 ± 0,00714	0,1936 ± 0,00168
	Ácida	0,1831 ± 0,00314	0,1818 ± 0,00638	0,1941 ± 0,00146	0,1410 ± 0,00578	0,1837 ± 0,00727

O teste t pareado avaliou as diferenças entre as amostras dos cinco municípios estudados comparando os resultados obtidos com a solubilização alcalina e digestão ácida com o bloco digestor.

Conforme pode ser observado na Tabela 16, para todas as amostras dos cinco municípios, a comparação entre os dois métodos estudados, os valores de t encontrados foram menor que o t crítico, indicando que estatisticamente em um nível de confiança de 95% não há diferenças significativas para as concentrações obtidas para os sete analitos estudados comparando com os dois métodos. Indicando desta forma equivalência entre os mesmos, sendo portanto vantajoso a solubilização alcalina, que por sua vez não utiliza reagentes concentrados e trata-se de um procedimento relativamente rápido.

Tabela 16 – Aplicação do teste t pareado com 6 graus de liberdades para as amostras estudadas comparando os resultados da solubilização alcalina e decomposição por via úmida em sistema semi-aberto

Amostras/municípios	t calculado	t crítico
Jaguaquara	1,07	2,45
Jequié	-0,95	2,45
Lagedo do Tabocal	-1,28	2,45
Manoel Vitorino	-0,40	2,45
Maracás	-1,16	2,45

6. CONCLUSÕES

O tratamento das amostras com o método proposto mostrou ser uma metodologia simples, rápida e confiável na quantificação dos teores de quase todos os analitos estudados nas amostras de carnes de bode. As recuperações encontradas para o Zn foram baixas, requerendo estudos mais aprofundados para este analito. Os estudos do efeito de matriz comprovaram que para os metais Ca, Cu, Fe e Mg é possível a utilização da padronização externa, no entanto, para o Na, K e Zn é recomendado a padronização por adição padrão, considerando que as curvas obtidas por padronização externa não compensam o efeito de matriz.

Estatisticamente em um nível de confiança de 95% não houveram diferenças significativas para os valores encontrados experimentalmente nas carnes de bode para ambos os métodos comparados com os valores certificados.

As pequenas quantidades de amostras e reagentes requeridas no método proposto, geram menores quantidades de resíduos estando em acordo com o que é preconizado pela química verde. Por outro lado, a digestão ácida utilizando o bloco digestor necessitou de ácidos fortes em elevadas temperaturas e demanda maior de tempo.

A simplicidade do procedimento proposto para a preparação da amostra de carne de bode, a minimização dos riscos de contaminação, a redução de tempo na preparação das amostras, a estabilidade a longo prazo que as amostras tratadas com TMAH possuem, a quantidade reduzida de reagentes necessários, e o baixo custo da instrumentação requerida tornam este procedimento excelente alternativa para a preparação de amostras de carnes de bode para análise elementar.

A utilização da otimização multivariada permitiu verificar as possíveis interações entre as variáveis, além da redução do trabalho laboratorial, gerando informações relevantes para o mapeamento dos fatores que poderiam afetar o sistema.

A solubilização assistida por ultrassom em meio alcalino de TMAH, viabilizou de maneira econômica e efetiva a solubilização de carnes de bode liofilizadas. O método proposto concordou muito bem com os resultados obtidos utilizando a solubilização convencional em bloco digestor cujo procedimento foi na presença de ácidos fortes e aquecimentos.

A metodologia proposta foi considerada adequada, podendo ser empregada com sucesso para o preparo de amostras de carnes de bode e determinação por espectrometria de absorção e emissão atômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] **IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SiDRA.** Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2017>. Acesso em: 09 out. 2018.

[2] **IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2017**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>. Acesso em: 10 out. 2018

[3] SILVA SOBRINHO, A. G. S.; MORENO, G. M. B. **Produção de carnes ovina e caprina e cortes da carcaça**. In: Seminário Nordestino De Pecuária, 2009, Fortaleza. Resumos. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. 2009. p.37.

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

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

[6] MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIOR, M. J. **O efeito do ultra-som em reações químicas.** Química Nova, v. 23, p. 251-256, 2000.

[7] CAVALHEIRO, C. V. **Extração de Compostos Fenólicos Assistida por Ultrassom e Determinação de Ácidos Graxos e Minerais em Folhas de Olea Europaea L**. 2013. 93f. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos -Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

[8] NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. **Sample preparation in alkaline media**. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, v. 61. p. 465-495, 2006.

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

[10] AZCARATE, S. M.; SAVIO, M.; SMICHOWSKI, P.; MARTINEZ, L. D; CAMIÑA, J. M.; GIL, R. A. **Single-step solubilization of milk samples with N,N-dimethylformamide forinductively coupled plasma-mass spectrometry analysis and classification based on their elemental composition.** Talanta, v.143, p. 64-70, 2015.

[11] NOGUEIRA FILHO, A. **Ações de fomento do banco do Nordeste e potencialidades da caprino-ovinocultura**. In: Simpósio internacional sobre caprinos e ovinos de corte. Anais. João Pessoa: Governo do Estado da Paraíba. João Pessoa. v. 2, p. 43-55. 2003.

[12] SILVA, M. G. C. M; DINIZ, C. R.; ROSADO, A. C. **Criação Racional de Caprinos.** Universidade Federal de Lavras**.** Minas Gerais: Nobel, 2015. p.8.

[13] **FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível: <https Disponível em: http://www.fao.org/home/en/. Acesso em: 18 out. 2018.

[14] JÚNIOR, O. A. C. **Animais de médio porte II**. Brasília: NT Editora, 2017 p. 29.

[15] SILVA, M. G. C. M.; DEL VALLE, T. A. **Produção de caprinos**. Lavras: Ed. UFLA, 2018. p. 29.

[16] MEDEIROS, B.B. L. **Proporção tecidual, características físicas, químicas e sensoriais da carne de caprinos de diferentes grupos raciais e aspectos comportamentais**. 2009, 130 f. Dissertação de mestrado em Zootecnia. Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu. São Paulo, 2009.

[17] LIMA JUNIOR, D.M.; RANGEL, A.H.N.; URBANO, S.A.; MACIEL, M.V.; AMARO, L.P.; **Alguns aspectos Qualitativos da Carne Bovina: Uma revisão**. Acta Viterinaria Brasilica, v.5, p.351-358, 2011.

[18] MADRUGA, M.S. **Perspectivas de Mercados para a Industrialização das Carnes Caprinas e Ovinas.** In: Encontro Nacional de Produção de Caprinos e Ovinos. Anais. Campina Grande, 2006.

[19] MARTÍNEZ-CEREZO, S.; SAÑUDO, C.; PANEA, B., OLLETA, J. L. **Breed, slaughter weight and ageing time effects on consumer appraisal of three muscles of lamb.** Meat Science, v.69, p.795-805, 2005.

[20] MADRUGA, M. S.; NARAIN, N.; DUARTE, T. F.; SOUZA, W.H.; GALVÃO, M. S.; CUNHA, M. G. G.; RAMOS, J. J. F; **As Características químicas e sensoriais de cortes comerciais de caprinos SRD e mestiços de Bôer**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 25, 713-719, 2005.

[21] MADRUGA, M. S. **Processamento e industrialização dos produtos da caprinocultura.** In. Seminário Nordestino de Pecuária. Anais. Fortaleza: Federação da Agricultura e Pecuária do Estado do Ceará. Seção Caprino-ovinocultura. Fortaleza. v. 9, p. 1-15. 2005.

[22] GARCIA, I. F. F; JÚNIOR, I. L. **Influência do manejo produtivo na qualidade da carne caprina e ovina.** I Simpósio sobre Qualidade de Carne Ovina e Caprina. Produção, Rendimento, Normas e Padrões de Qualidade. Anais. Fortaleza. v. 1, p. 1-34. 2011.

[23] MADRUGA, M. S.; ARRUDA, S. G. B.; ARAÚJO, E. M.; ANDRADE L. T.; NASCIMENTO, J. C.; COSTA, R. G. **Efeito da idade de abate no valor nutritivo e sensorial da carne caprina de animais mestiços**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.19, p.374-379, 1999.

[24] POTCHOIBA, M. J.; LU, C. D; PINKERTON, F.; SAHLU, T. **Effects of all-milk diet on weight gain, organ development, carcass characteristics and tissue composition, including fatty acids and cholesterol contents, of growing male goats**. Small Ruminante Research, v.3, p.583- 592, 1990.

[25] ZAPATA, J.F.F.; SEABRA, L.M.J.; NOGUEIRA, C.M.; BARROS, N.N. **Estudo da qualidade da carne ovina no Nordeste brasileiro: Propriedades físicas e sensoriais**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 20, p. 274-277, 2000.

[26] CARVALHO, M. L.; SANTIAGO, S.; NUNES; M. L. **Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle.** Anal Bioanal Chem, v. 382, p. 426-432, 2005.

[27] SEMEDO, M. F. F. R. **Importância Médico-Legal dos Metais Essenciais: Cobre e Zinco**. 2014, 89 f. Dissertação de mestrado em Medicina Legal. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto. Portugal, 2014.

[28] ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 2 ed., 1998, p.602.

[29] AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade.** São Paulo: Editora Aheneu, 2003.

[30] BOR, T. H.; CHEN, Y. C.; YING, C. C.; KAI, Y. C. **Relationship between the level of essential metal elements in human hair and coronary heart disease.** Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry, v. 290, p. 165-169, 2011.

[31] FRANÇA, N. A. G.; MARTINI, L. A. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes- Cálcio**. Força-tarefa Alimentos Fortificados e Suplementos Comitê de Nutrição. v.1, 2014.

[32] HEANEY, R. P. **Calcium intake and disease prevention.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 50, p.685- 693, 2006.

[33] ORTEGA, R. M.; LÓPEZ-SOBALER A. M.; JIMÉNEZ ORTEGA, A. I.; NAVIA LOMBÁN, B. **Ingesta y fuentes de calcio en una muestra representativa de escolares españoles**. Nutrición Hospitalaria, v. 27, p. 715- 723, 2012.

[34] PEREIRA, G. A. P.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. **Cálcio dietético- estratégias para otimizar o consumo**. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 49, p. 172-180, 2009.

[35] KEHRIG, H. A.; COSTA, M.; MALM, O. **Estudo da contaminação por metais pesados em peixes e mexilhão da baia de Guanabara - Rio de Janeiro**. Tropical Oceanography Online, v. 35, p. 38-39, 2007.

[36] SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 4.ed., 1994, p.1450.

[37] BIANCHI, M.L.P.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, J.E.D. **Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v.42, p. 94-100, 1992.

[38] FANTINI, A. P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SOUZA, M. C.; MANSI, D. N. **Disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 28, p. 435- 439, 2008.

[39] ANTUNES, P. L.; SGARBIERI, V.C. **Fatores antinutricionais, toxicidade e valor nutricional do feijão comum (*Phaseolus vulgaris,* L.)**. Agros, v.15, p.39-62, 1980.

[40] ZIMMERMANN M. B.; HURRELL R. F. **Nutritional iron deficiency**. The Lancet, v. 370, p.511-520, 2007.

[41] ALVARENGA, G. **Nutrição: a importância dos nutrientes para uma vida saudável**. Rio de Janeiro: editora, 2010, p.1-23.

[42] SEVERO, J. S.; MORAIS, J. B. S.; FREITAS, T. E. C.; CRUZ, K. J. C.; OLIVEIRA, A. R. S.; POLTRONIERI, F.; MARREIRO, D. N. **Metabolic and Nutritional Aspects of Magnesium**. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria. v. 35, p. 67-74, 2015.

[43] PEREIRA, T. C.; HESSEL, G. **Deficiência de zinco em crianças e adolescentes com doenças hepáticas crônicas**. Revista Paulista de Pediatria, v.27, p. 322-328, 2009.

[44] DOMENE, S. M. A; PEREIRA, T. C; ARRIVILLAGA, R. K. **Estimativa da disponibilidade de zinco em refeições com preparações padronizadas da alimentação escolar do município de Campinas**. Revista de Nutrição, v.21, p.161-167, 2008.

[45] GIBSON R. S. **Zinc: the missing link in combating micronutrient malnutrition in developing countries**. Proceedings of the Nutrition Society, v. 65, p.51-60, 2006.

[46] **Food Ingredients Brasil. Dossiê: os minerais na alimentação**. Disponível em: <http://revista-fi.com.br/>. Acesso em: 14 set. 2018.

[47] BARCELOS, T. D. J. **Cobre: vital ou prejudicial para a saúde humana?** 2008. 70 f. Dissertação de mestrado em Medicina. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 2008.

[48] BORGES, V. A. **O alto teor de sódio presente nos alimentos e suas consequências: um estudo de caso com alunos do 9º ano no município de IV centenário**. 2014, 34 f. Pós graduação. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Paraná, 2014.

[49] **World Health Organization – WHO. Reducing salt intake populations: report of a WHO forum and technical meeting**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43653/9789241595377_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 dez. 18.

[50] BAZANELLI, A. P.; CUPPARI, L. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Sódio**. Força-tarefa Alimentos Fortificados e Suplementos Comitê de Nutrição ILSI Brasil, p. 09, 2017.

[51] TOMAZONI, T.; SAVIERO, J. **Consumo de potássio de idosos hipertensos participantes do Programa Hiperdia do município de Caxias do Sul, RS.** Revista Brasileira de Hipertensão, v. 16, p. 246-250, 2009.

[52] SILVA, J. S. **Modificação e validação da metodologia para determinação de sódio, potássio e fósforo em alimentos industrializados.** 2013, 117f. Dissertação de mestrado em Produção Vegetal - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro. 2013.

[53] **World Health Organization – WHO: issues new guidance on dietary salt and potassium**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/salt_potassium_20130131/en/>. Acesso em: 13 ago.18.

[54] KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo: EditSBQ, 2016, p.199-215.

[55] MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIOR, M. J. **O efeito do ultra-som em reações químicas.** Química Nova, v. 23, p. 251-256, 2000.

[56] COSTA, L. M.; SILVA, F. V.; GOUVEIA, S. T.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. **Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation of the residual carbon content**. Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy, v. 56, p. 1981-1985, 2001.

[57] NUNES, J. A. **Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb, e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino.** 2009, 94 f. Dissertação de mestrado em Toxicologia - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

[58] SOUSA, R. A.; CAMPOS, N. S.; ORLANDO, R. **Preparação de amostras para análises elementar.** Apostila de apoio – Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2015, p. 1-26.

[59] **SACHEMINC.** Disponível em: <https://sacheminc.com/other-chemicals/tetramethylammonium-hydroxide-tmah/>. Acesso em: 03 fev.2019]

[60] JACKSON, A. J.; MICHAEL, L. M.; SCHUMACHER, H. J. **Improved tissue solubilization for atomic absorption**. Analytical Chemistry, v.44, p. 1064-1065, 1972.

[61] MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. **Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization**. Microchemical Journal, v. 76, p. 23-29, 2004.

[62] MARTINS, P.; POZEBON, D.; DRESSLER, V.L.; KEMIECIKI, G. A. **Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation.** Analytica Chimica. Acta, v. 470, p. 195-204, 2002.

[63] POZEBON, D.; DRESSLER, V. L. D.; CURTIUS, A. J. **Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide**. Journal Analytical Atomic Spectrometry, v. 13, p. 1101-1105, 1998.

[64] GROMBONI, C. F. **Teores dos Elementos Químicos Essenciais e Tóxicos na Rastreabilidade da Carne Bovina.** 2012. 119 f. Tese de doutorado em Ciências - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2012.

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

[66] ARANHA, T. S. C. P.; OLIVEIRA, A.; QUEIROZ, H. M.; CADORE, S. **A fast alkaline treatment for cadmium determination in meat samples**. Food Control, v. 59, p.447-453, 2016.

[67] DAMIN, I. C. F. **Investigação da amostragem direta para determinação de elementos traço em carne in natura e em petróleo usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2009, 134 f. Tese de doutorado em Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

[68] RODRIGUES, J. L.; TORRES, D. P.; SOUZA, V. C. O.; BATISTA, B. L., SOUZA, S. S.; CURTIUS, A. J.; BARBOSA, F. J. **Determination of total and inorganic mercury in whole blood by cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (CV-ICP-MS) with alkaline sample preparation**. Journal Analytical. Atomic Spectrometry, v.24, p.1414-1420, 2009.

[69] BATISTA, B. L.; GROTTO, D; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. J. **Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature**. Analytica Chimica Acta, v.646, p.23-29, 2009.

[70] RODRIGUES, J. L; NUNES, J. A.; BATISTA, B. L.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F. J. **A fast method for the determination of 16 elements in hair samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature**, Journal. Analytical Atomic. Spectrometry, v.23, p.992-996, 2008.

[71] SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M. POHL, P. **Fast method of elements determination in slim coffees by ICP OES**. Food chemistry, v.146, p.220-225, 2014.

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

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

[74] BEIK, J. V.; KOSERA, V. S.; MARANHÃO, T. A.; CHAVES, E. S. **Alkaline solubilization and ultrasound assisted extraction for Cr and Pb determination in leather by atomic absorption spectrometry.** Analytical Methods, v.9, p. 3284-3289, 2017.

[75] GHISI, M.; CHAVES, E. S.; QUADROS, D. P. C.; MARQUES, E. P.; CURTIS, A. J.; MARQUES, A. L.B. **Simple method for the determination of cu and fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide**. Microchemical Journal, v.98, p.32-35, 2011.

[76] NUNES, A. M.; ACUNHA, S. T.; OROESTE, E. Q.; LEPRI, F. G.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J.; RIBEIRO, A. S. **Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 22, p. 1850-1857, 2011.

[77] OLIZ, C. M.; PEREIRA, C. C.; VIEIRA M. A.; RIBEIRO, A. S.; NUNES, A. M. **Avaliação de tratamentos da amostra em microescala para a determinação de K, Mg, Na e Zn em carnes por técnicas de espectrometria atômica**. Revista Química Nova, v.36, p. 972-977, 2013.

[78] SAVIO, M.; ORTIZ, M. S. ALMEIDA, C. A.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L. D.; GIL, R. A. **Multielemental analysis in vegetable edible oils by inductively coupled plasma mass spectrometry after solubilisation with tetramethylammonium hydroxide.** Food Chemistry, v.159, p.433-438, 2014.

[79] TORRRES, D. P.; MARTINS-TEIXEIRA, M. B; CADORE, S.; QUEIROZ, H. M. **Sequential factorial designs for method development of the determination of Cd and Pb in fish and shrimp by GF AAS after sample freezedrying and tetramethylammonium hydroxide solubilization.** Analytical Methods, v.8, p. 4263-4271, 2016.

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

[81] SOARES, A. R.; NASCENTES, C. C. **Development of a simple method for the determination of lead in lipstick using alkaline solubilization and graphite furnace atomic absorption spectrometry**. Talanta, v.105, p. 272-277, 2013.

[82] TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, W. N. L.; et al. **Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology.** Microchemical Journal, v. 92, p. 58-67, 2009.

[83] BEZERRA, M. A. **Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para a determinação de cobre usando espectrometria de absorção atômica com chama.** 2003. 95 f. Dissertação de Mestrado em Ciências – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2003.

[84] FERREIRA, S. L. C. **Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015, p.1-90.

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

[86] DERRINGER, G., SUICH, R., **Simultaneous Optimization of Several Response Variables**. Journal of Quality Technology, v.12, p.214-219, 1980.

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

[88] **BRASIL. Ministério da Saúde. Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-> Acesso em: 08 jul. 2018

[89] **BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).** Disponível em: <http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Validacao-Inmetro.pdf.>. Acesso em: 17 jun. 18.

[90] AMARANTE, O. P. J; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R.; VALE, M. L. B. F. **Validação de métodos analíticos: uma breve revisão**. Cadernos de Pesquisa, v.12, p. 116-131, 2001.

[91] OLIVEIRA, F. M. **Controle da Qualidade Analítica**. LABWIN – Serviços Especializados Ltda, 2006, p. 2.