

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

PRISCILLA CARÔSO DA ROCHA

Aplicação de planejamento de mistura para digestão de amostras de café em pó usando ácido diluído visando a quantificação de Cu e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

Dezembro / 2022

PRISCILLA CARÔSO DA ROCHA

Aplicação de planejamento de mistura para digestão de amostras de café em pó usando ácido diluído visando a quantificação de Cu e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

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

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes (UESB)

Coorientador: Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva (IFBA)

JEQUIÉ – BA

Dezembro / 2022

TERMO DE APROVAÇÃO

PRISCILLA CARÔSO DA ROCHA

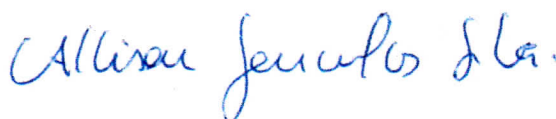
“Aplicação de planejamento de mistura para otimização de um procedimento de digestão de amostras de café em pó usando ácido diluído visando a quantificação de metais por espectrometria de absorção atômica com chama”

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.

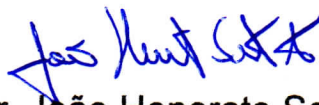
COMISSÃO EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva
(UFBA, Salvador – BA, 2013)



Prof. Dr. João Honorato Santos Neto
(UFBA, Salvador – BA, 2020)



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

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 08 / 12 / 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades e por me guiar até aqui.

A toda minha família, em especial meus pais, Vanusa e Bira, e meu irmão Guilherme, que sempre estão presentes em minha vida, por todo amor e incentivo.

Ao meu companheiro Tarcisio, por toda ajuda, cuidado e incentivo durante todo esse percurso.

Aos amigos, em especial Danilo, Erison, Fabricio, Odair, Suelen e Taionara por estarem e fazerem parte de mais uma etapa da minha vida e pelos muitos momentos de partilha.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes, um agradecimento especial por todos os ensinamentos, dedicação de seu tempo, confiança, compreensão e paciência durante a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (PGQUI/UESB) pela oportunidade concedida e aos docentes deste Programa por todos os ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo pagamento integral de bolsa de mestrado incluindo prorrogação por mais 06 meses. Agradecimento também ao CNPq pelo financiamento de projeto de pesquisa aprovado na Chamada Universal 01/2016 - Faixa A, processo nº 431491/2016-0, recurso essencial para o desenvolvimento das atividades.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica III, Anderson, Lânio, Luana, Márcio, Rosivan, Uneliton e Victor pelo apoio, amizade, solidariedade e contribuições significativas no desenvolvimento do trabalho.

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

Ao Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva, do Laboratório de Análises Ambientais do Extremo Sul da Bahia do Instituto Federal da Bahia, pela parceria, orientação, receptividade e colaboração nas análises utilizando a técnica MIP OES.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imagens de um local de produção de café onde foi coletada uma das amostras.....	7
Figura 2. Região experimental do planejamento de mistura com restrições.....	9
Figura 3. Superfícies de resposta obtidas no planejamento de mistura para avaliação da absorção de (a) Cu e (b) Zn por FAAS.....	14
Figura 4. Gráficos de contorno obtidos no planejamento de mistura para avaliação da absorção de (a) Cu e (b) Zn por FAAS.....	14
Figura 5. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtido no planejamento da mistura para avaliação da RM usando os dados obtidos por FAAS.....	15
Figura 6. Valor predito versus Valor observado para o modelo cúbico especial usando RM obtida por FAAS.....	16
Figura 7. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtido no planejamento de mistura para avaliação da RM usando os dados obtidos por MIP OES.....	16
Figura 8. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtidos no planejamento de mistura utilizando acidez residual como resposta.....	17
Figura 9. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtidos no planejamento de mistura utilizando imagem digital como resposta.....	18
Figura 10. Curva de calibração para cobre.....	21
Figura 11. Curva de calibração para zinco.....	21
Figura 12. Concentração de Cu e Zn nas amostras de café analisados por FAAS..	25

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Uso de procedimentos de digestão para determinação de metais por técnicas espectroanalíticas.....	5
Tabela 2. Descrição dos pontos de coleta das amostras de café em pó.....	7
Tabela 3. (a) Domínio experimental aplicado e (b) matriz para o planejamento de mistura.....	9
Tabela 4. Resultados preliminares obtidos para digestão de café em pó.....	12
Tabela 5. (a) Domínio experimental aplicado e (b) matriz e respostas para o planejamento de mistura.....	13
Tabela 6. Comparação dos modelos aplicados aos dados obtidos no planejamento de mistura.....	20
Tabela 7. Informações relativas às curvas de calibração do Cu e Zn.....	21
Tabela 8. Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação (n=3).....	22
Tabela 9. Resultados para o estudo de repetibilidade para Cu e Zn por FAAS...	23
Tabela 10. Concentrações dos microelementos nas amostras de café.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CV	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
LQ	Limite de Quantificação
MIP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês <i>Microwave-induced plasma optical emission spectrometry</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Componente Principal, do inglês <i>Principal Component</i>
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PNRH	Política Nacional de Recursos Hídricos
R²	Coeficiente de determinação
RM	Resposta Múltipla

Aplicação de planejamento de mistura para digestão de amostras de café em pó usando ácido diluído visando a quantificação de Cu e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

Autora: Priscilla Carôso da Rocha

Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

Coorientador: Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva

RESUMO: A cultura do café é de grande importância no cenário brasileiro, já que o Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo. Cada vez mais os consumidores buscam por cafés de melhores qualidades para seu consumo. O objetivo deste trabalho foi aplicar um planejamento de mistura para digestão de amostras de café em pó usando ácido diluído. O estudo quantificou Cu e Zn por meio da técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Três abordagens diferentes foram utilizadas para avaliar o desempenho do procedimento de digestão (resposta múltipla, acidez residual e análise por imagem digital). A condição ideal e eficiente estabelecida pelo estudo usando o planejamento de mistura foi 1,75 mL de HNO_3 7,0 mol L^{-1} , 0,5 mL de H_2O_2 30% e 2,25 mL de água ultrapura, nas condições de temperatura de 150° C e tempo de digestão de 3,5 horas. O melhor modelo que gerou as superfícies de resposta e os gráficos de contorno foi obtido pela aplicação do modelo cúbico especial. O método desenvolvido apresentou boa exatidão, precisão, robustez instrumental e boa linearidade. Ao realizar a aplicação do método em amostras reais, as concentrações de cobre tiveram médias variando entre 6,54 a 14,07 $\mu\text{g g}^{-1}$ e de zinco entre 6,82 a 11,96 $\mu\text{g g}^{-1}$, indicando que todas apresentaram valores inferiores ao valor máximo estabelecido pelo órgão supervisor.

Palavras-chave: Planejamento de mistura, Digestão ácida, Resposta múltipla, Análise por imagem digital.

Application of mixing design for digestion of powdered coffee samples using dilute acid for the quantification of Cu and Zn by flame atomic absorption spectrometry (FAAS)

Author: Priscilla Carôso da Rocha

Advisor: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

Co-advisor: Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva

ABSTRACT: The coffee crop is of great importance in the Brazilian scenario, as Brazil is the largest coffee producer and exporter in the world. Consumers are increasingly looking for better quality coffees for their consumption. The objective of this study was to apply mixing design for the digestion of powdered coffee samples using dilute acid. The study quantified Cu and Zn using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Three different approaches were used to evaluate digestion performance: multiple response, residual acidity and digital image analysis. The ideal and efficient condition established by the study using mixture design was 1.75 mL of 7.0 mol L⁻¹ HNO₃, 0.5 mL of 30% H₂O₂ and 2.25 mL of ultrapure water, at 150 °C and a digestion time of 3.5 hours. The best model that generated response surfaces and contour graphs was obtained by applying the special cubic model. The developed method showed good accuracy, precision, instrumental robustness and good linearity. When applying the method in real samples, the average copper concentrations ranged from 6.54 to 14.07 µg g⁻¹ and zinc between 6.82 and 11.96 µg g⁻¹, indicating that they presented values lower than the maximum established by the supervisory body.

Keywords: Mixture design, Acid digestion, Multiple response, Digital image analysis.

SUMÁRIO

	pág.
APRESENTAÇÃO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	6
2.1. Instrumentação.....	6
2.2. Reagentes e soluções.....	6
2.3. Coleta das amostras.....	6
2.4. Preparo das amostras.....	8
2.5. Ensaios preliminares para a digestão das amostras.....	8
2.6. Otimização do sistema de digestão das amostras.....	8
2.6.1. Função resposta múltipla.....	10
2.6.2. Acidez residual.....	10
2.6.3. Análise por imagem digital.....	10
2.7. Faixa linear de trabalho do método.....	11
2.8. Exatidão do método.....	11
2.9. Precisão do método.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
3.1. Resultados dos ensaios preliminares da digestão.....	12
3.2. Otimização do método de digestão de amostra.....	13
3.3. Faixa linear de trabalho do método.....	21
3.4. Exatidão do método.....	22
3.5. Precisão do método.....	22
3.6. Aplicação do método.....	23
4. CONCLUSÃO.....	26
5. PERSPECTIVAS.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação de Mestrado faz parte dos estudos desenvolvidos no âmbito do Projeto de Pesquisa denominado *Caracterização química e avaliação dos impactos causados por substâncias potencialmente tóxicas em amostras ambientais e alimentos provenientes da Bacia Hidrográfica do Rio de Contas*. Este projeto está cadastrado na Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UESB.

O trabalho de dissertação foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica III da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Jequié. As análises utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) foram realizadas no Laboratório de Química Analítica da UESB e as análises utilizando as técnicas de emissão óptica com plasma foram realizadas no Laboratório de Análises Ambientais do Extremo Sul da Bahia, em parceria com o coorientador Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva (IFBA).

Este trabalho foi escrito seguindo o formato de *Publicação*, conforme as orientações constantes no *Manual para Elaboração de Dissertações* do Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUI-UESB). A escrita da dissertação seguiu as instruções do periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society (JBCS)*, para submissão após as alterações sugeridas pela banca examinadora. O Periódico é enquadrado como estrato A2 na CAPES e Fator de Impacto de 2,135 (JCR 2022).

Link para acesso ao Manual de dissertações do PGQUI:

<http://www2.uesb.br/ppg/ppgquimica/wp-content/uploads/2018/09/Manual-para-elabora%C3%A7%C3%A3o-de-disserta%C3%A7%C3%A3o-Vers%C3%A3o-Final-01.04.pdf>

1. INTRODUÇÃO

O café é obtido de um arbusto da família Rubiaceae e do gênero *Coffea*, das quais mais de cem espécies são conhecidas. No entanto, somente duas dessas espécies tem importância econômica, a *Coffea arábica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta, também conhecida como conilon), sendo o café arábica mais aceito pelos consumidores por considerarem uma melhor qualidade.¹

O Brasil atualmente é o maior produtor e exportador de café do mundo, ocupando cerca de 35% do mercado internacional, sendo os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná os responsáveis pela maior parte dessa produção.² Em relação ao consumo, o café é considerado uma das bebidas mais apreciadas no mundo, por apresentar sabor e aroma agradáveis. Porém, os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto à sua qualidade, que está intimamente relacionada aos atributos sensoriais, os quais dependem de alguns fatores como o cultivo, manejo na lavoura, tipos de colheita, secagem e armazenamento. Esta qualidade está associada à composição química, que varia também de acordo com a espécie e tratamento térmico aplicado.^{3,4}

Os principais constituintes do café são os lipídeos, açúcares, proteínas, cafeína, celulose, água e micronutrientes (Co, Cu, F, Fe, Mn, Se, Zn, etc.), e, por conta disso, apresenta atividade antibacteriana e antioxidante, além de substâncias benéficas para o cérebro humano.⁵

O cobre é considerado um elemento essencial para o ser humano, apresentando funções específicas no organismo, como o envolvimento no metabolismo esquelético, metabolismo energético, sistema imunológico e também agindo na redução do risco de doenças cardiovasculares.⁶

O zinco também é um micronutriente que desempenha diversas funções no organismo humano, tendo, por exemplo, sua essencialidade na atividade de diversas enzimas. Além disso, o Zn está envolvido no metabolismo do RNA e DNA, metabolismo de lipídios e carboidratos, metabolismo energético, dentre outros.⁷

No entanto, espécies potencialmente tóxicas, tais como chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio, podem estar presentes nesta matriz provenientes de solos contaminados, etapas no processamento industrial e aplicação inadequada de defensivos agrícolas.⁸ Adicionalmente, alguns elementos considerados micronutrientes que se apresentam naturalmente no café podem apresentar caráter potencialmente tóxico se as concentrações excederem os limites permitidos e essas concentrações em excesso podem ser oriundas de fontes já mencionadas anteriormente. No caso do

Cu e Zn, os teores máximos permitidos são de 50 µg/g para zinco e 30 µg/g para cobre em alimentos em geral.⁹

Por isso, ao longo dos anos pesquisadores têm despertado interesse em estudar a composição química dessas espécies, a fim de atender critérios como qualidade e segurança aos consumidores. Portanto, o desenvolvimento de metodologias eficientes para atender a essas demandas torna-se uma atividade de extrema importância.

Quando realizada a extração, seja por qual for o método, diversos fatores podem afetar nos resultados, como tempo de extração, temperatura, pH, tamanho da partícula, umidade, tipo de solvente, dentre outros.¹⁰ Em estudos quantitativos, objetivando o teor total de metais na amostra, geralmente aplica-se o procedimento de digestão, onde ocorre a decomposição da matriz orgânica, sendo utilizado, normalmente, um ácido forte. O ácido nítrico é um ácido forte e um agente oxidante bastante poderoso, assim, quase todos os nitratos de metais são solúveis em água. O poder oxidante do ácido nítrico é aumentado quando da utilização de um agente oxidante auxiliar, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Tal reagente apresenta as vantagens de ser um agente oxidante poderoso, a água é o único produto de decomposição presente e ainda é encontrado com alto grau de pureza.¹¹

Os ácidos são substâncias que reagem com a maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos. Quando utilizados como solventes, possuem uma grande vantagem, pois são eficazes na solubilização das amostras. No entanto, também se apresentam como substâncias corrosivas, principalmente quando se trabalha com soluções padrões concentradas. Dessa forma, torna-se atrativo o uso de ácidos diluídos no processo de digestão de amostras por inúmeras vantagens, tais como: i) redução da quantidade de reagentes adicionados durante a reação; ii) minimização da quantidade de resíduos gerados; iii) segurança do analista; iv) diminuição dos valores do branco e v) redução nos custos. Além disso, a eficiência obtida usando ácido nítrico diluído pode ser explicada pela habilidade de regeneração ácida na presença de oxigênio proveniente do peróxido. A presença de oxigênio na fase gasosa dentro de um sistema fechado contribui para o processo de oxidação da matéria orgânica que posteriormente é reabsorvido pela fase líquida.^{12,13}

Com os avanços dos estudos sobre o preparo de amostras, descobriu-se que a digestão ácida assistida por micro-ondas e por sistemas de ultrassons obteve progresso, pela vantagem em usar pouco reagente e conseguir destruir a matéria orgânica, permitindo um resultado livre de contaminações.¹²

Para avaliar a eficiência da digestão, diferentes abordagens de planejamento multivariado têm sido utilizadas. Entre elas, destaca-se o planejamento de mistura, uma técnica bastante eficiente na otimização de procedimentos de digestão.^{14,15}

Através do planejamento de mistura, busca-se extrair, por processos experimentais, informações sobre o objeto de pesquisa em questão, analisando as previsões estatísticas acerca das melhores condições para se realizar um experimento, como, por exemplo, o estudo das proporções de cada componente de uma mistura, além do melhor tempo e temperatura. Essa técnica multivariada vem sendo utilizada com frequência em estudos, uma vez que o método proporciona características analíticas mais sensíveis, eficientes, exatas e precisas.¹⁶

No planejamento, diferentes respostas ou sinais analíticos podem ser utilizados como ferramenta para avaliar a eficiência da estratégia adotada, tais como acidez residual, teor de carbono residual, sinais de absorvância ou de emissão, etc.

A eficiência das digestões ácidas pode ser avaliada através de procedimentos de acidez residual em amostras digeridas, uma vez que soluções muito ácidas podem danificar o sistema de introdução de amostras do equipamento bem como pode provocar alterações nos processos de atomização e excitação.¹⁷ Na Tabela 1 estão apresentados alguns trabalhos usando diferentes concentrações de ácido nítrico no procedimento de digestão da amostra visando à determinação de íons metálicos usando diferentes técnicas espectroanalíticas.

Com base nessa preocupação, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver um procedimento de digestão através da aplicação de planejamento de mistura para otimizar os componentes de uma mistura (ácido nítrico diluído, peróxido de hidrogênio e água) na digestão de amostras de cafés em pó.

Tabela 1. Uso de procedimentos de digestão para determinação de metais por técnicas espectroanalíticas.

Analitos	Amostra	Condições de digestão	Técnica de digestão	Ref.
K, Mg, Ca, Na, Mn, Fe, Cu, Zn, Co, Pb, Cd	Pó de café e resíduo da infusão de café	HNO ₃ / HClO ₄ / 4 h / 350 °C / 0,5 g de amostra em pó	Bloco de digestão Kjeldahl	18
Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn	Café torrado	4 h / 270 °C / 5 mL de HNO ₃ / 1,5 mL de HClO ₄ / 0,5 g de amostra	Digestão úmida	19
K, Mg, Ca, Na, Mn, Cu e Zn, Cd e Pb	Café torrado e moído	5,0 mL de HNO ₃ / 3,0 mL de H ₂ O ₂	Digestão úmida assistida por micro-ondas	20
Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn	Café verde	0,5 g de amostra / 5,0 mL de HNO ₃ / 1,5 mL de HClO ₄ / 270 °C	Digestão úmida	21
Cd, Pb, Ni e Zn	Café torrado e moído	2,0 g de amostra / 8,0 mL de HNO ₃ / 2,0 mL de HClO ₄ / 0,5 mL de H ₂ SO ₄ / 150 °C	Digestão úmida	22
K, Mg, Ca, Mn, Cu, Zn, Cd, Pb e Cr	Café cru e torrado	0,3 g de amostra Café cru: 3,0 mL de HNO ₃ concentrado / 3,0 mL de H ₂ O ₂ Café torrado: 5,0 mL de HNO ₃ concentrado / 3,0 mL de H ₂ O ₂	Digestão por micro-ondas	23
Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn	Infusões de café	1,0 mL de uma solução concentrada de HNO ₃ / 10,0 mL da amostra / 90–100 °C até redução do volume para cerca de 1,0 mL	Digestão oxidativa úmida	24
K, Mg, Ca, Fe, Al, Mn, Cu, Ba, Sr, Zn, Cr, Pb, Ni, V, Co, Ga, U, Cd, Ag, Li, In, Bi, Th, Ti	Café verde e torrado	0,3–0,4 g de uma amostra / 6,0 mL HNO ₃ / 2,0 mL de H ₂ O ₂	Digestão por microondas	25
Ca, Mg, Fe e Mn	Cafés solúveis	0,5 ou 1 g de amostra / 5,0 mL de HNO ₃ / 5,0 mL de H ₂ O ₂	Digestão úmida com frasco aberto	26

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentação

No estudo foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica em chama (FAAS) ar/acetileno Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA), modelo PinAAcle 500 equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo. Lâmpadas de cátodo oco foram utilizadas como fonte de radiação e as condições operacionais do espectrômetro foram as sugeridas pelo fabricante. Os comprimentos de onda utilizados foi 324,75 nm para Cu e 213,86 nm para Zn.

Outro instrumento utilizado no estudo foi o Espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), modelo 4210 (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália), com monocromador tipo Czerny-Turner, equipado com nebulizador OneNeb, câmara de nebulização e tocha de quartzo.

2.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram todas preparadas com água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA; resistividade de 18,2 MΩ cm). Soluções de ácido nítrico, preparadas por diluição apropriada de solução estoque 65% (Merck, Darmstadt, Alemanha), e de peróxido de hidrogênio 30% foram utilizadas na etapa de digestão. Soluções padrão de Cu e Zn para calibração foram preparadas a partir de soluções estoque de cada elemento (1000 mg mL⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Biftalato de potássio P.A. (Biotec, Paraná, PR, Brasil) foi utilizado para determinar a acidez residual. Vidrarias convencionais de laboratório, previamente descontaminada com HNO₃ 10% por 24 h, foram utilizadas.

2.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em cidades das regiões Sudoeste e Chapada Diamantina, Bahia. O interesse na aquisição das amostras de café foi coletar diretamente de pequenos produtores e em comunidades de agricultura familiar. Em algumas cidades não foi possível obter as amostras com esse perfil e foi adquirido através de supermercados. Uma amostra (Salvador) foi adquirida fora da região de interesse, apenas para nível de comparação. A Tabela 2 apresenta uma descrição dos pontos de coleta com informações adicionais sobre as amostras e a Figura 1 apresenta um dos locais de coleta das amostras de café em pó.

Tabela 2. Descrição dos pontos de coleta das amostras de café em pó.

Município de coleta	Café (espécie)	Informações adicionais
Barra da Estiva	Arábica	Produção de agricultura familiar / aquisição diretamente com o produtor
Barra do Choça	Arábica	Café com propósito orgânico / aquisição em supermercado
Brumado	Sem informação no rótulo	Produção industrial em larga escala / aquisição em supermercado
Ibicoara	Arábica	Café agroecológico / torra artesanal / aquisição em supermercado
Itapetinga	Sem informação no rótulo	Produção industrial em larga escala / aquisição em supermercado
Itiruçu	Sem informação no rótulo	Produção industrial em larga escala / aquisição em supermercado
Ituaçu	Arábica	Produção de agricultura familiar / aquisição em supermercado
Maracás	Arábica	Produção de agricultura familiar / aquisição diretamente no local de plantio
Poções	Arábica	Produção de agricultura familiar / aquisição em feira livre
Salvador	Arábica	Produção industrial em larga escala / aquisição em supermercado

Figura 1. Imagens de um local de produção de café onde foi coletada uma das amostras.



Fonte: própria.

2.4 Preparo das amostras

Na digestão das amostras sólidas, aproximadamente 0,2000 g foi pesado diretamente dentro dos copos de teflon e em seguida foi submetida ao procedimento de digestão ácida, em que 2,25 mL de água ultrapura, 1,75 mL de ácido nítrico ($7,0 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 30% foram adicionados à amostra. Tais proporções apresentadas foram as condições otimizadas, mas condições diferentes foram testadas em estudos preliminares e na aplicação do planejamento de mistura. A mistura foi colocada em bombas de aço e submetida à estufa em temperatura de $\pm 150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3,5 horas. Após esse período, esperou-se o resfriamento das amostras e avolumou-se com água ultrapura para um volume final de 10,0 mL. A solução final foi submetida para análise por FAAS e também por MIP OES. Soluções de brancos foram preparadas de forma semelhante.

2.5 Ensaios preliminares para a digestão das amostras

Foram realizados estudos preliminares de forma univariada a fim de identificar quais seriam as melhores condições de alguns parâmetros (concentração de ácido nítrico, massa de amostra e tempo) para se realizar as digestões utilizando amostras de café em pó. Como resposta foi avaliada visualmente a característica do digerido. Após esses estudos, foi aplicado um planejamento de mistura para otimizar as proporções dos reagentes contidos na solução digestora.

2.6 Otimização do sistema de digestão da amostra

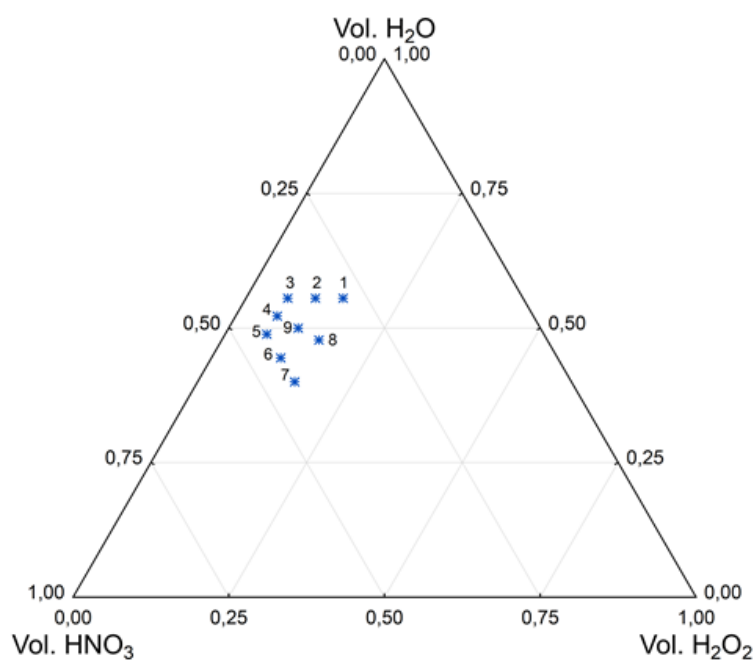
Após os estudos preliminares, um planejamento de mistura com restrições foi aplicado para otimizar o volume de três componentes empregados na digestão das amostras (água ultrapura, ácido nítrico $7,0 \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio 30%). Uma amostra de café em pó foi usada no estudo de otimização. A Tabela 3 apresenta o domínio experimental estabelecido e a matriz experimental, realizada de forma aleatória, e a Figura 2 demonstra a região experimental delimitada.

Tabela 3. (a) Domínio experimental aplicado e (b) matriz para o planejamento de mistura.

<i>(a) Domínio experimental</i>			
Variáveis (mL)	Mínimo	Máximo	
Água ultrapura	1,80	2,50	
HNO ₃ (7,0 mol L ⁻¹)	1,30	2,00	
H ₂ O ₂ 30%	0,3	0,7	

<i>(b) Matriz experimental</i>			
Exp.	Volume (mL)		
	H ₂ O	HNO ₃	H ₂ O ₂
1	2,20	2,00	0,3
2	1,80	2,00	0,7
3	2,50	1,70	0,3
4	2,50	1,30	0,7
5	2,00	2,00	0,5
6	2,35	1,85	0,3
7	2,15	1,65	0,7
8	2,50	1,50	0,5
9.1	2,25	1,75	0,5
9.2	2,25	1,75	0,5
9.3	2,25	1,75	0,5

Figura 2. Região experimental do planejamento de mistura com restrições.



Como respostas foram utilizadas três abordagens diferentes: 1) A função Resposta Múltipla (RM); 2) A acidez residual do digerido e 3) Análise por imagem digital. Em todas as abordagens os resultados foram avaliados usando o software Statistica 12.

2.6.1 Função Resposta Múltipla

A função RM tem a finalidade de representar um conjunto de dados apresentando apenas um valor, priorizando o valor máximo ou mínimo em função da condição que se busca para uma determinada análise. Essa função tem sido largamente aplicada na otimização de estratégias analíticas envolvendo determinações multielementares e neste estudo foi usada para estabelecer uma condição ideal para a extração dos dois analitos (Cu e Zn) simultaneamente.²⁷

A função RM foi usada para os dados normalizados de absorvância do Cu e Zn obtidos por FAAS e também para os dados normalizados de emissão do Cu e Zn obtidos por MIP OES. As duas técnicas foram usadas com o objetivo de validar a técnica instrumental aplicada no método (absorção atômica). A RM é calculada como mostra a equação 1, onde R_{xi} é a resposta analítica de um elemento em um experimento particular e LS_{xi} é a maior resposta em um conjunto de experimentos para aquele elemento. O somatório dessas frações resulta na RM.

$$MR = \left[\frac{R_{x1}}{LS_{x1}} + \frac{R_{x2}}{LS_{x2}} + \frac{R_{x3}}{LS_{x3}} \dots \frac{R_{xn}}{LS_{xn}} \right] \quad \text{Eq. (1)}$$

2.6.2 Acidez residual

A acidez residual do digerido é um parâmetro bastante utilizado para avaliar a eficiência nos procedimentos de digestão. Para calcular a acidez residual foi utilizada uma solução padronizada de hidróxido de sódio 0,08988 mol L⁻¹ em um processo de titulação de neutralização usando 100 µL de digerido final.

2.6.3 Análise por imagem digital

Outra abordagem, realizada de forma inédita em sistemas de digestão ácida, foi a utilização da imagem digital como resposta analítica. Essa abordagem não foi usada como mecanismo de quantificação de Cu e Zn nas amostras de café em pó, visto que no meio reacional não foi gerado cor oriunda da presença dos elementos analisados. Mas, no intuito de investigar as potencialidades da técnica de imagem digital para auxiliar nos parâmetros investigados na eficiência da digestão.

Foi utilizado um sistema de colorimetria de imagem com um microscópio portátil multifunção Supereyes (Shenzhen, Guangdong, China) para obtenção das imagens, uma caixa branca isolada da luz externa e iluminada com luz branca proveniente da lâmpada de LED (6W). Para a transferência das informações digitais foi necessário uma conexão do microscópio ao notebook via porta USB e um aplicativo AMCap, responsável pela captura da imagem e transformação para o formato JPG.

2.7 Faixa linear de trabalho do método

A linearidade é a capacidade que um método tem de gerar resultados diretamente proporcionais às concentrações das espécies determinadas dentro de uma faixa analítica específica. No estudo a linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2). Através de uma função matemática é possível estabelecer a correlação entre o sinal analítico obtido e soluções de concentrações conhecidas, expressa pela equação da curva de calibração ou equação da reta ($y = ax + b$). Uma curva de calibração foi construída para cobre com concentrações de 0 (branco) a 0,75 mg L⁻¹ e para zinco com concentrações de 0 (branco) a 0,3 mg L⁻¹.

2.8 Exatidão do método

A exatidão de um método pode ser avaliada pela concordância entre um resultado médio de experimentos e um valor de referência aceito, podendo ser auferida através da utilização de material de referência certificado, por meio de testes de adição e recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz ou ainda por meio de testes interlaboratoriais.

Devido a indisponibilidade de material certificado para amostra de café em pó, foram feitos testes de adição antes da digestão usando soluções com concentrações conhecidas nas proporções de 0,05, 0,30 e 0,50 mg L⁻¹ para Cu e 0,15 e 0,30 mg L⁻¹ para Zn e avaliação da recuperação.

2.9 Precisão do método

A precisão avalia o grau de incerteza de um método devido à dispersão das respostas instrumentais e da execução dos ensaios. Esse parâmetro é calculado em termos de desvio padrão relativo, calculado pela razão entre o desvio padrão das medidas experimentais em uma determinada concentração e a média das concentrações, geralmente expresso em percentagem.

Neste estudo a precisão foi expressa como repetibilidade, sendo realizados 8 ensaios utilizando o procedimento de digestão otimizado para uma mesma amostra de café. As digestões foram realizadas em dois dias diferentes usando quatro bombas de aço.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados dos ensaios preliminares da digestão

Os resultados para os parâmetros concentração de ácido nítrico, massa de amostra de café em pó e tempo obtidos nos primeiros ensaios de digestão estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados preliminares obtidos para digestão de café em pó.

Amostra	Condição	Volumes (mL)	Massa da amostra (g)	Tempo	Temperatura	Resultado
A1	1	i) H ₂ O = 2,2	0,0519	3,5 h	150 °C	Não digeriu totalmente
A2		ii) H ₂ O ₂ = 0,9	0,0517	4 h		
A3		iii) HNO ₃ 4,0	0,1050	3,5 h		
A3		mol L ⁻¹ = 0,9	0,1005	4 h		
A4	2	i) H ₂ O = 3,5	0,1020	3,5 h	150 °C	Digeriu totalmente
A5		ii) H ₂ O ₂ = 0,5	0,1023			
A6		iii) HNO ₃ 7,0	0,1052	4 h		
A7		mol L ⁻¹ = 2,0	0,1029			
A8	3	i) H ₂ O = 3,5	0,2015	3,5 h	150 °C	Digeriu totalmente
		ii) H ₂ O ₂ = 0,5				
A9		iii) HNO ₃ 7,0 mol L ⁻¹ = 2,0	0,2030			

Os resultados para a condição 1 usando menor concentração de ácido nítrico diluído (4,0 mol L⁻¹) e volume menor do ácido (0,9 mL) com as condições de tempo e temperatura apresentadas demonstraram que tais condições não proporcionaram de forma suficiente uma digestão com aspecto límpida e sem a presença de sólidos em suspensão. A condição 2, usando maior volume e concentração do ácido e menor volume de peróxido, apresentou melhores resultados e já foi possível obter uma solução límpida e sem a presença visível de sólidos em suspensão. A condição 3 adotou as mesmas condições para tempo, temperatura e proporções dos reagentes, apenas aumentando a massa de amostra pesada. Os digeridos apresentaram as mesmas características visuais e, portanto, foram fixados os parâmetros tempo (3,5 h), temperatura (150 °C) e massa (aproximadamente 0,2000 g) para os ensaios do planejamento de mistura realizados em seguida. Os volumes dos reagentes foram melhor avaliados através da aplicação do planejamento.

3.2 Otimização do método de digestão de amostras

Após a avaliação preliminar realizada com os experimentos relatados, que definiu a tomada de decisão para a otimização do método, foi aplicado um planejamento de mistura com restrições para avaliar três variáveis presentes em uma solução usada para digestão de amostra de pó de café. As variáveis foram: volume de água ultrapura, volume de ácido nítrico 7,0 mol L⁻¹ e volume de peróxido 30%.

Três diferentes abordagens (RM, Acidez residual e Imagem digital) foram utilizadas para avaliar o procedimento em um nível de confiança de 95%. As variáveis, o domínio experimental aplicado e as diferentes respostas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. (a) Domínio experimental aplicado e (b) matriz e respostas para o planejamento de mistura.

(a) Domínio experimental							
Variáveis (mL)				Mínimo		Máximo	
Àgua ultrapura				1,80		2,50	
HNO ₃ (7,0 mol L ⁻¹)				1,30		2,00	
H ₂ O ₂ 30%				0,3		0,7	
(b) Matriz experimental e respostas							
Exp.	Volume (mL)			Respostas			
	H ₂ O	HNO ₃	H ₂ O ₂	RM (FAAS)	RM (MIP OES)	Acidez Residual (%)	Imagem digital (pixels)
1	2,20	2,00	0,3	1,70	1,43	8,82	2,054
2	1,80	2,00	0,7	1,69	1,39	9,78	0,405
3	2,50	1,70	0,3	1,63	1,38	8,03	0,960
4	2,50	1,30	0,7	1,97	1,56	6,90	0,473
5	2,00	2,00	0,5	1,74	1,33	10,55	1,470
6	2,35	1,85	0,3	1,74	1,39	9,01	2,077
7	2,15	1,65	0,7	1,50	1,72	8,44	0,735
8	2,50	1,50	0,5	1,66	1,95	4,31	2,023
9.1 (PC)	2,25	1,75	0,5	1,91	1,77	9,19	1,507
9.2 (PC)	2,25	1,75	0,5	1,83	1,55	9,78	1,757
9.3 (PC)	2,25	1,75	0,5	1,82	2,00	10,64	2,235

PC: Ponto Central; FAAS: espectrometria de absorção atômica em chama; MIP OES: espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas.

Inicialmente foi avaliado como resposta o sinal de absorvância obtido para Cu e Zn, separadamente, utilizando a técnica espectrométrica de absorção atômica (FAAS). As superfícies de resposta e os gráficos de contorno obtidos pela aplicação do modelo cúbico especial estão apresentados nas Figuras 3 e 4, respectivamente, gerados pelo programa Statistica 12.

Figura 3. Superfícies de resposta obtidas no planejamento de mistura para avaliação da absorção de (a) Cu e (b) Zn por FAAS.

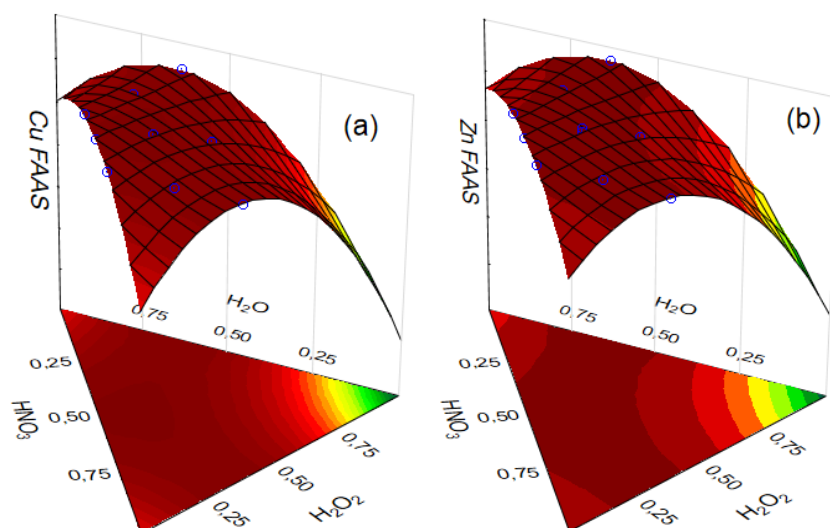
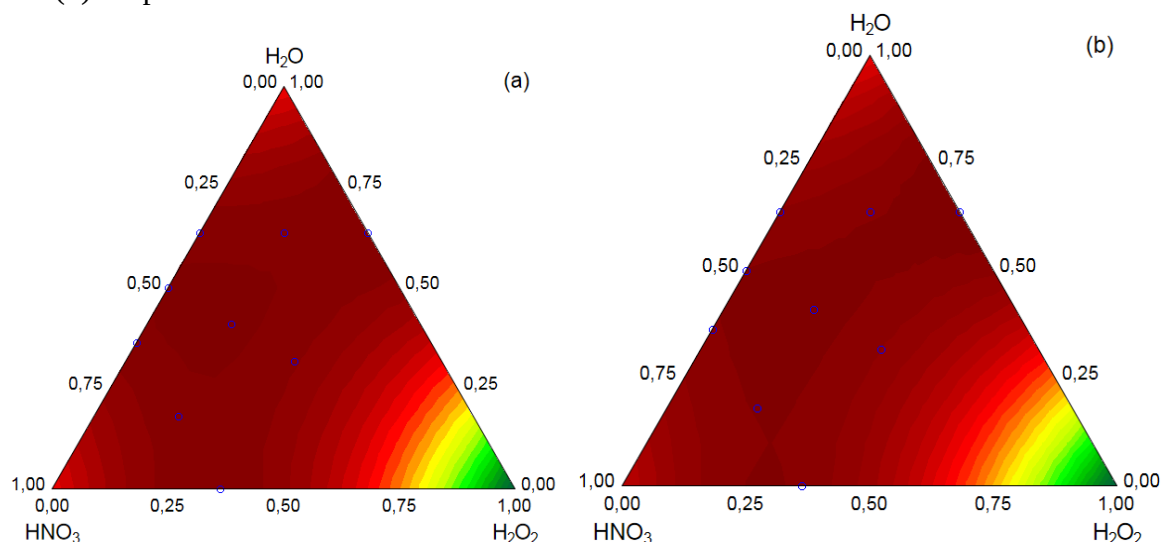


Figura 4. Gráficos de contorno obtidos no planejamento de mistura para avaliação da absorção de (a) Cu e (b) Zn por FAAS.

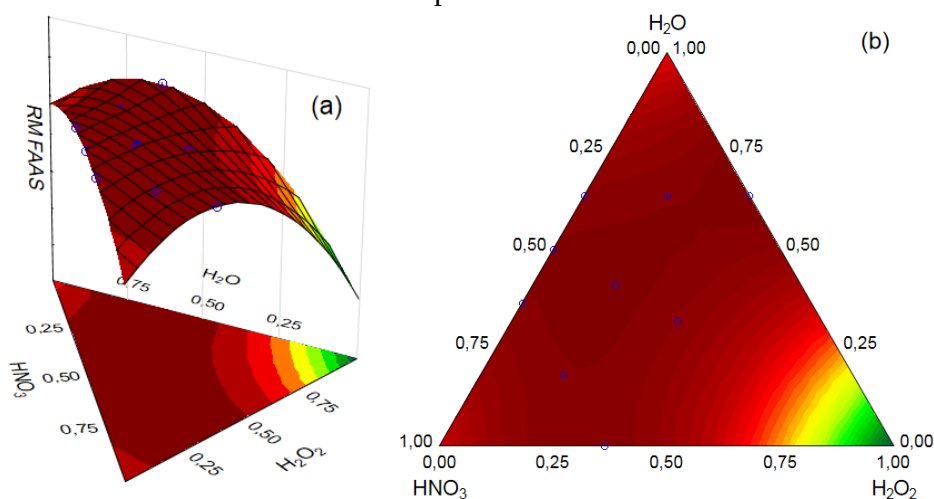


Analisando visualmente as superfícies da Figura 3 é possível perceber que existe uma região de máximo quando se tem condições experimentais intermediárias analisando o Cu como analito. Nestas condições, o Zn também apresenta uma região de máximo, no entanto, existem outras

condições dentro do domínio experimental aplicado que também favorece a máxima extração do Zn. Os sinais de máximo estão representados pela região de cor vermelha intensa nas figuras.

No intuito de tentar otimizar uma condição única ideal para digestão de Cu e Zn simultaneamente, foi utilizada a função RM, que é o somatório das absorvâncias individuais após devida normalização. A superfície de resposta e o gráfico de contorno obtidos também pela aplicação do modelo cúbico especial estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtido no planejamento da mistura para avaliação da RM usando os dados obtidos por FAAS.



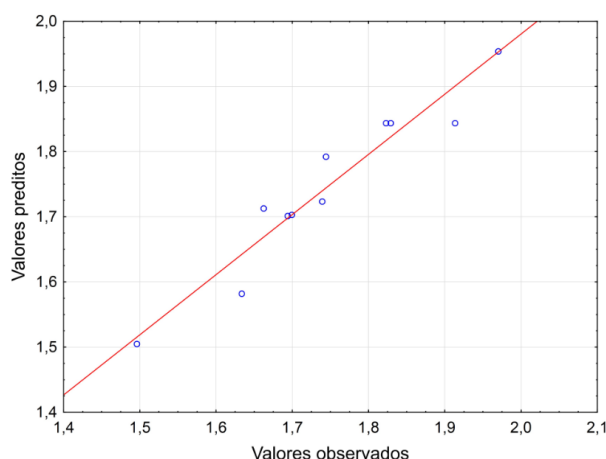
Analisando os gráficos da Figura 5 é possível observar que existe a mesma tendência no comportamento dos dados avaliando a RM (FAAS) quando comparado com as absorvâncias individuais para Cu e Zn. Isso demonstra que a função RM representa integralidade nas informações processadas.

É possível observar na Figura 5 e na Tabela 5 que os melhores resultados para extração de Cu e Zn são realizados no ensaio 4 e nos experimentos usando ponto central. Apesar do sinal obtido no ensaio 4 ter sido um pouco maior, é mais prudente utilizar como norteador os resultados do ponto central porque a robustez desses resultados está melhor avaliada, visto que ensaios foram realizados na “vizinhança” e no ensaio 4 os experimentos para ácido nítrico e peróxido foram usados em condições extremas (1,3 mL de HNO_3 e 0,7 mL de H_2O_2) dentro do domínio experimental aplicado. A menor extração de Cu e Zn foi obtida no ensaio 7 usando 1,65 mL de HNO_3 7,0 mol L^{-1} e 0,7 mL de H_2O_2 .

Tanto para os resultados individuais quanto global foi feita a análise do modelo e o que mostrou significância foi o cúbico especial, caracterizando no modelo que melhor se ajusta aos dados obtidos. A avaliação do modelo foi feita pela ANOVA (Análise de Variância), na qual a falta de ajuste não é significativa, com valor de p (0,3749) superior a 0,05. Dentre as variáveis, apenas o

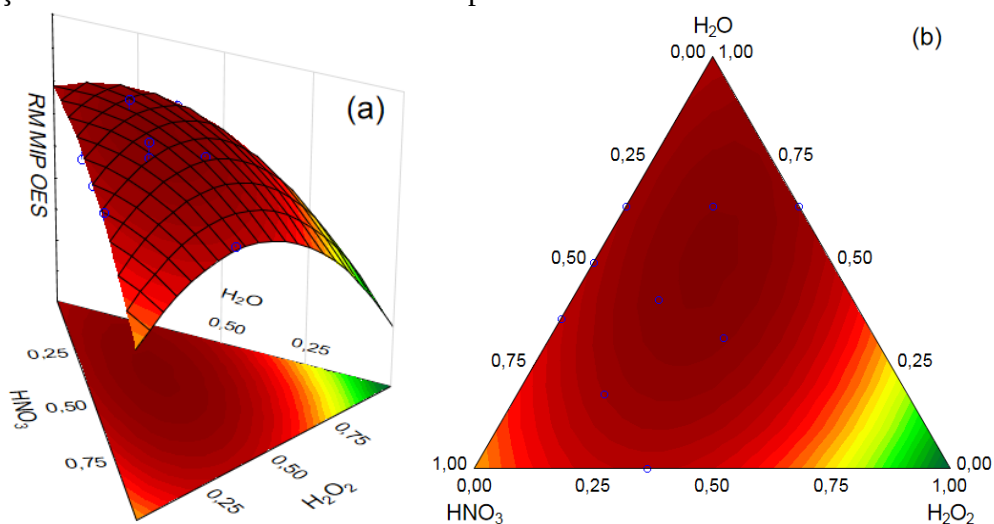
volume de H_2O_2 mostrou-se significativo. Também foi feita a análise do gráfico de valores preditos versus valores observados, apresentado na Figura 6. A boa correlação entre eles reforça a informação de que o modelo cúbico especial está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no planejamento.

Figura 6. Valor predito versus Valor observado para o modelo cúbico especial usando RM obtida por FAAS.



A nível de validação instrumental, as amostras do planejamento foram analisadas para Cu e Zn em um laboratório do IFBA/Porto Seguro utilizando uma técnica espectroanalítica de emissão (MIP OES). A função RM também foi aplicada aos dados de emissão do Cu e Zn, após devida normalização. A superfície de resposta e o gráfico de contorno obtidos pela aplicação do modelo cúbico especial estão apresentados na Figura 7.

Figura 7. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtido no planejamento de mistura para avaliação da RM usando os dados obtidos por MIP OES.

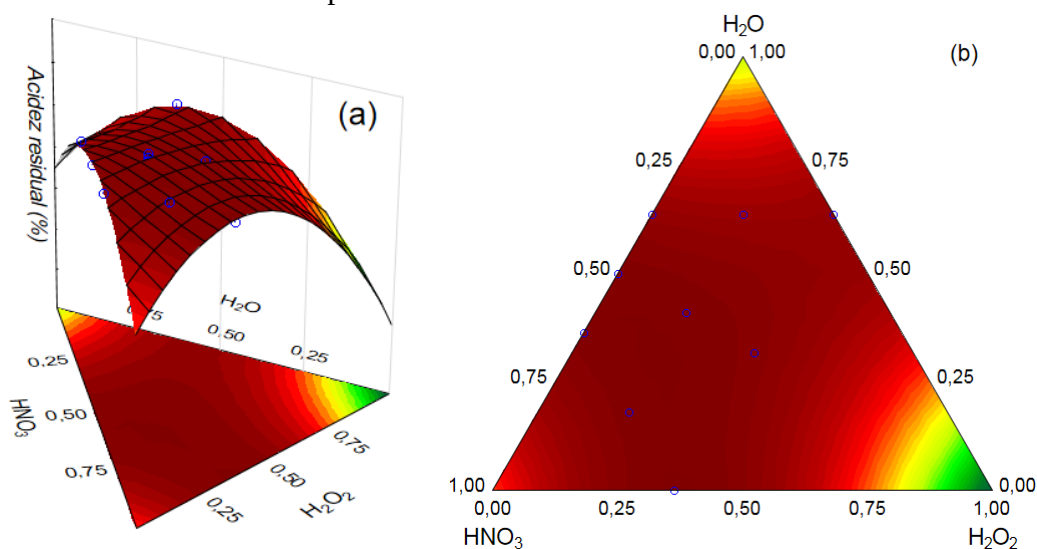


É possível observar na Figura 7 e na Tabela 5 que os melhores resultados para extração de Cu e Zn são realizados no ensaio 8 (1,5 mL de HNO_3 e 0,5 mL de H_2O_2) e nos experimentos usando ponto central (1,75 mL de HNO_3 e 0,5 mL de H_2O_2). Em ambos os experimentos a robustez dos resultados está bem representada. A menor extração de Cu e Zn foi obtida no ensaio 5 usando 2,0 mL de HNO_3 7,0 mol L^{-1} e 0,5 mL de H_2O_2 .

Analisando os gráficos obtidos é possível observar que o modelo cúbico especial usando a RM por MIP OES apresenta boa similaridade no comportamento dos dados quando comparado com a RM por FAAS. Isso demonstra que as duas técnicas (FAAS e MIP OES) responderam de forma semelhante à presença dos analitos na solução, conferindo assim uma robustez instrumental ao método.

Outro parâmetro que foi analisado através do planejamento de mistura para avaliar a eficiência da digestão foi a acidez residual. Os resultados obtidos na forma de superfície de resposta e gráfico de contorno estão representados na Figura 8.

Figura 8. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtidos no planejamento de mistura utilizando acidez residual como resposta.

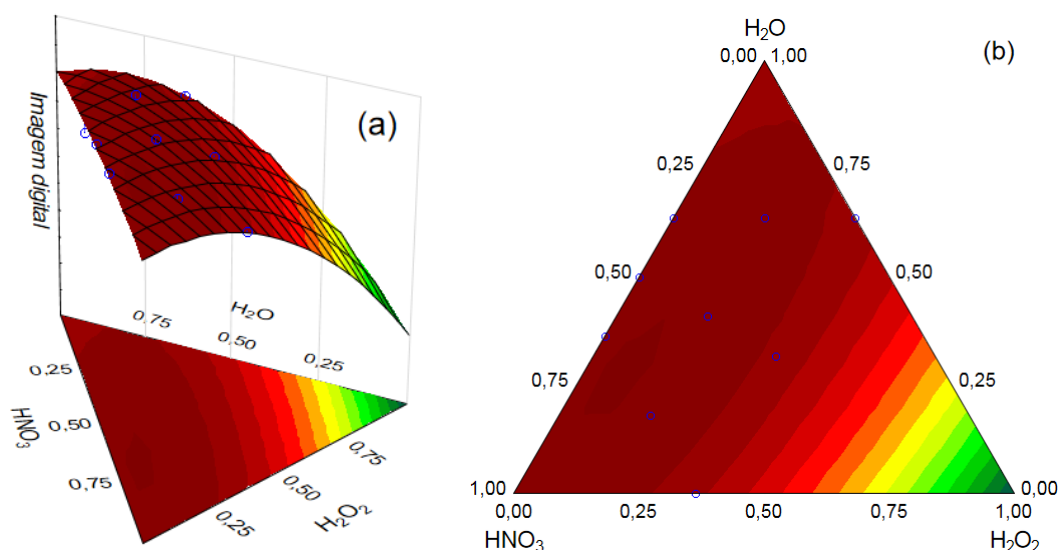


Analisando os gráficos da Figura 8 observa-se que existe uma tendência no aumento do resíduo de acidez quando utilizado experimentos com maior quantidade de ácido nítrico 7,0 mol L^{-1} . No entanto, tais resultados não comprometeram a eficiência da digestão, visto que todas as soluções apresentaram aspecto límpido e sem a presença de sólidos em suspensão. Pode-se observar também que os volumes de peróxido utilizados não apresentam tanta significância, visto que diferentes resultados de acidez residual foram obtidos utilizando os volumes de peróxido iguais (ensaios 5 e 8 da Tabela 5).

Em técnicas espectrométricas, como FAAS e MIP OES, é aconselhável trabalhar com soluções com acidez inferior a 10% v v⁻¹ para evitar alterações no transporte de aerossóis durante a introdução da amostra. Praticamente todos os ensaios apresentaram acidez residual menor que 10%, com exceção apenas para o ensaio 5 (10,55%) e um dos pontos centrais (10,64%). No caso do ensaio 5, o volume de ácido utilizado foi o maior dentro do domínio experimental avaliado (2,0 mL). O ensaio que apresentou menor acidez residual foi o 8 (4,31%), usando um volume intermediário de ácido (1,5 mL). No entanto, o ensaio que proporcionou a menor acidez residual não apresentou a maior eficiência na extração do Cu e Zn quando avaliado a RM por FAAS. Assim, uma opção ideal é trabalhar com condições intermediárias, que atendam bem à extração dos analitos, sem gerar uma acidez maior que 10%. Os volumes aplicados nos experimentos dos pontos centrais atendem bem à essa exigência.

É importante destacar que em todos os ensaios foram usados um volume de ácido nítrico diluído (7,0 mol L⁻¹). O uso de ácido diluído no processo de digestão de amostras torna-se atrativo, pois diminui a quantidade de reagentes adicionados durante a reação, reduz os valores do branco e pode ser utilizado junto com peróxido de hidrogênio para potencializar a digestão devido à regeneração do ácido nítrico no meio. Erro! Indicador não definido.

Figura 9. (a) Superfície de resposta e (b) Gráfico de contorno obtidos no planejamento de mistura utilizando imagem digital como resposta.



Analisando a Figura 9 e a Tabela 5 observa-se que existe um aumento no sinal medido (pixels) quando aplicado os ensaios 1, 6, 8 e os realizados no ponto central. Por outro lado, os menores sinais foram obtidos nos ensaios 2, 4 e 7. Ainda não foi possível afirmar se um digerido

resultante de um processo de digestão eficiente proporciona um meio que capta mais ou menos sinal de luz.

É de conhecimento que um processo de digestão eficiente tende a disponibilizar os elementos para a solução. No entanto, estudos novos precisam ser elaborados com o objetivo de avaliar se a interação de uma fonte de luz com o meio resultante será positiva (maior quantidade de pixels absorvida) ou negativa (mais transparência do meio). Ainda assim, esses resultados preliminares destacam a potencialidade que as ferramentas de análises digitais podem ter no auxílio aos diferentes procedimentos de preparo de amostra.

Para todas as respostas consideradas no planejamento de mistura foi avaliado os modelos linear, quadrático e cúbico especial. Para as respostas individuais de absorvância do Cu e Zn, bem como a RM por FAAS, o modelo cúbico especial foi o que melhor se ajusta aos dados experimentais. Para a acidez residual o modelo linear mostrou-se o mais significativo e para as respostas RM por MIP OES e imagem digital os modelos não foram significativos. Vale destacar que para todos os modelos avaliados, nenhum mostrou falta de ajuste significativa. A Tabela 5 resume os dados com os principais parâmetros estatísticos.

A partir dos resultados obtidos com a avaliação das diferentes respostas do planejamento de mistura, uma condição ideal que satisfaz tanto o aumento dos sinais de absorção ou emissão, bem como uma acidez residual dentro dos parâmetros aceitáveis pode ser obtida utilizando volumes intermediários dos reagentes utilizados. Adicionalmente, tais condições garantem uma melhor robustez ao método. Assim, uma condição eficiente que atenda simultaneamente a ambas as tendências corresponde à seguinte proporção: 1,75 mL de HNO_3 7,0 mol L^{-1} , 0,5 mL de H_2O_2 30% e 2,25 mL de água ultrapura, totalizando um volume de solução de 4,5 mL durante a digestão. Essas proporções foram usadas nos experimentos seguintes.

Tabela 6. Comparação dos modelos aplicados aos dados obtidos no planejamento de mistura.

Resposta	Modelo	SQ	gl	MQ	MS Error	F	p	R ²	R ² ajustado
Cu	Linear	0,000007	2	0,000003	0,000014	0,23417	0,796467	0,055304	0,000000
	Quadrático	0,000019	3	0,000006	0,000019	0,32888	0,805516	0,210996	0,000000
	Cúbico especial	0,000087	1	0,000087	0,000002	39,12069	0,003332	0,926810	0,817024
Zn	Linear	0,000223	2	0,000112	0,000236	0,47369	0,639108	0,105884	0,000000
	Quadrático	0,000979	3	0,000326	0,000181	1,80189	0,263465	0,570371	0,140741
	Cúbico especial	0,000692	1	0,000692	0,000053	12,97048	0,022729	0,898735	0,746837
RM FAAS	Linear	0,012166	2	0,006083	0,020738	0,29334	0,753459	0,068324	0,000000
	Quadrático	0,063338	3	0,021113	0,020513	1,02926	0,454440	0,424022	0,000000
	Cúbico especial	0,088868	1	0,088868	0,003424	25,95551	0,007009	0,923089	0,807722
RM MIP OES	Linear	0,139504	2	0,069752	0,052821	1,320549	0,319458	0,248198	0,060247
	Quadrático	0,226791	3	0,075597	0,039155	1,930725	0,242818	0,651691	0,303382
	Cúbico especial	0,000561	1	0,000561	0,048803	0,011498	0,919771	0,652689	0,131724
Acidez residual	Linear	17,48231	2	8,741154	1,926264	4,537880	0,048177	0,531500	0,414375
	Quadrático	3,93851	3	1,312836	2,294320	0,572212	0,657439	0,651239	0,302478
	Cúbico especial	4,04816	1	4,048157	1,855861	2,181283	0,213752	0,774311	0,435779
Imagem digital	Linear	2,015993	2	1,007996	0,321988	3,130544	0,099026	0,439033	0,298791
	Quadrático	1,551259	3	0,517086	0,204928	2,523256	0,171719	0,776859	0,553717
	Cúbico especial	0,022409	1	0,022409	0,250558	0,089436	0,779789	0,781739	0,454347

SQ = soma quadrática, gl = grau de liberdade, MQ = média quadrática, F = distribuição F de Fisher-Snedecor, valor p = nível de probabilidade, R² = coeficiente de determinação.

3.3 Faixa linear de trabalho do método

Na Tabela 7 estão apresentados os dados relativos às curvas de calibração do Cu e Zn. Os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99, o que implica boa linearidade das curvas. As curvas analíticas obtidas estão apresentadas nas Figuras 10 e 11. Os valores de Limite de Quantificação (LQ) do método atenderam bem aos valores apresentados nas amostras reais, sendo possível quantificar todas as amostras.

Tabela 7. Informações relativas às curvas de calibração do Cu e Zn.

Elemento	Equação	R^2	Linearidade (mg L ⁻¹)
Cu	$y = 0,211 * \text{Conc.} - 0,0005$	0,9991	*LQ – 0,75
Zn	$y = 0,7262 * \text{Conc.} - 0,0034$	0,9956	**LQ – 0,30

*LQ = 0,049 mg L⁻¹ (2,45 µg g⁻¹); **LQ = 0,063 mg L⁻¹ (3,15 µg g⁻¹).

Figura 10. Curva de calibração para cobre.

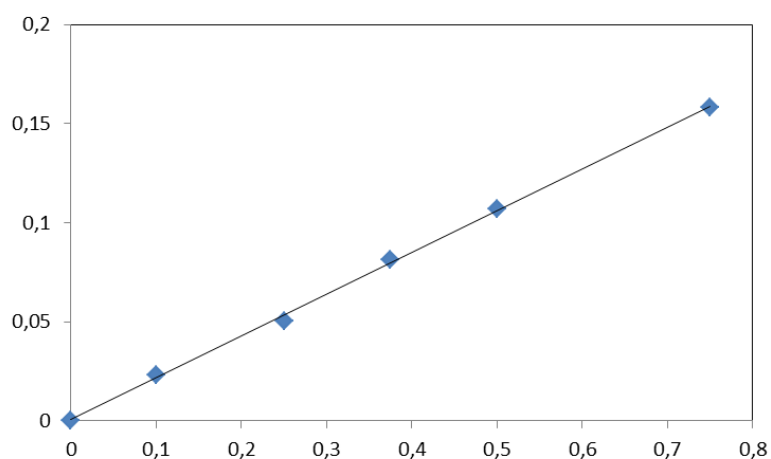
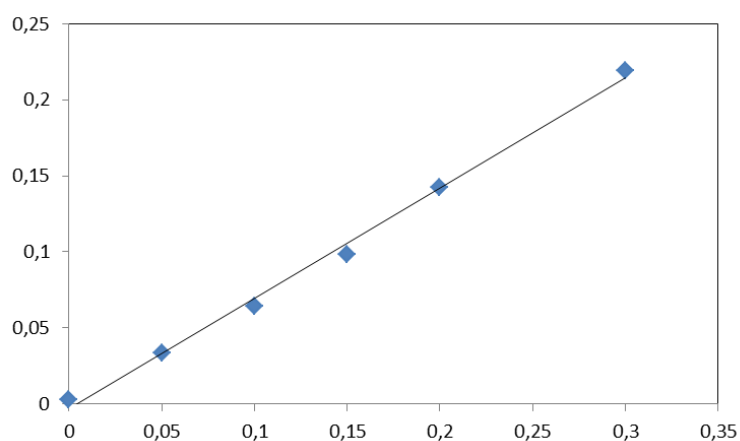


Figura 11. Curva de calibração para zinco.



3.4 Exatidão do método

Como forma de validação do método proposto foi realizado o procedimento utilizando testes de adição e recuperação (*spike*) para Cu e Zn e avaliação da recuperação. É importante destacar que os valores adicionados dos analitos foram em quantidades próximas à quantidade presente nas amostras. Os valores médios obtidos, desvio padrão e percentuais de recuperação estão apresentados na Tabela 8. Os resultados obtidos apresentaram uma boa recuperação, com percentuais de 98,3 a 116% para Cu e de 95,4 a 98,8% para Zn, resultados dentro da faixa assumida como aceitável (80-120%), podendo, portanto, ser aplicado com garantia nas amostras reais.

Tabela 8. Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação (n=3).

Adição padrão (mg L ⁻¹)	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
<i>(a) Cu</i>		
Amostra sem adição	0,308 ± 0,008	---
Amostra com adição de 0,050	0,366 ± 0,035	116
Amostra com adição de 0,30	0,603 ± 0,037	98,3
Amostra com adição de 0,50	0,820 ± 0,039	102
<i>(b) Zn</i>		
Amostra sem adição	0,0988 ± 0,0027	---
Amostra com adição de 0,15	0,247 ± 0,003	98,8
Amostra com adição de 0,30	0,385 ± 0,027	95,4

3.5 Precisão do método

A precisão foi avaliada aplicando-se um teste de repetibilidade, no qual foram realizadas 8 repetições de digestão de uma amostra de café em pó para posterior análise instrumental. Os resultados obtidos, na forma de coeficiente de variação, para Cu e Zn foram 5,13 e 14,71%, respectivamente. Os resultados individuais bem como o valor de média, desvio padrão e CV estão apresentados na Tabela 9. Apesar do valor mais alto obtido para o zinco, pode-se considerar que o procedimento desenvolvido apresenta boa precisão para ambos os analitos. A maior dispersão ocorrida para o zinco é considerada normal visto que a amostra analisada se trata de uma matriz que

apresenta características biológicas, sendo comum uma variação dos elementos dentro da própria matriz.

Tabela 9. Resultados para o estudo de repetibilidade para Cu e Zn por FAAS.

Analito	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)								Média	DP	CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Cu	11,35	9,91	11,12	10,79	10,37	11,71	12,16	12,38	11,22	0,58	5,13
Zn	9,48	8,19	10,08	13,78	9,05	10,67	13,83	11,02	10,76	1,58	14,71

DP: Desvio padrão; CV: Coeficiente de variação.

3.6 Aplicação do método

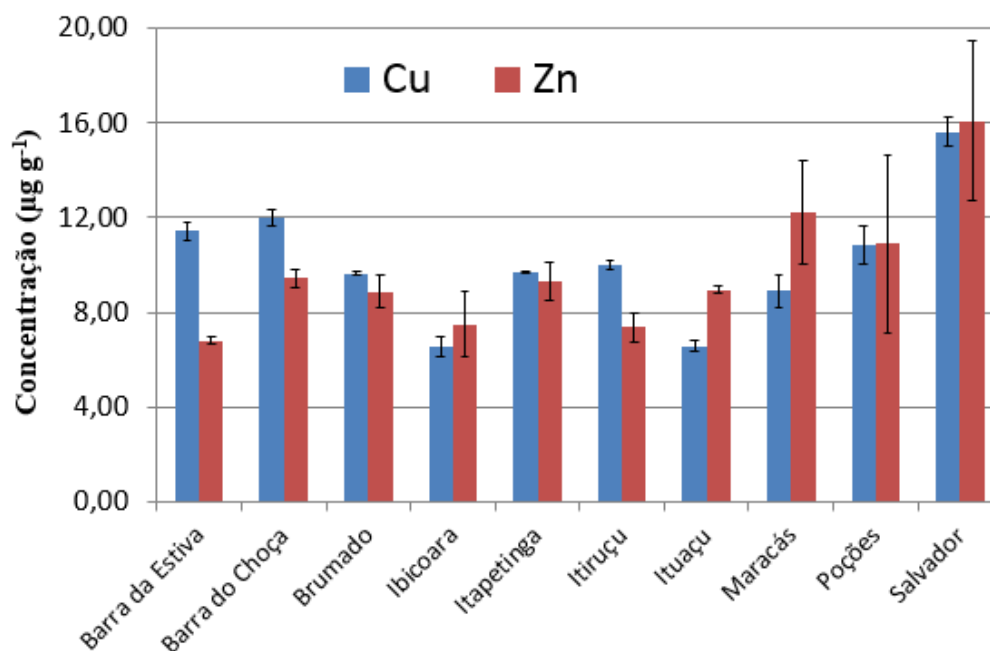
Após a otimização e validação, o método foi aplicado para quantificar Cu e Zn em amostras de cafés em pó adquiridos em diferentes municípios da Bahia. Na Tabela 10 estão apresentados os resultados expressos em média, desvio padrão ($n=3$) e coeficiente de variação (CV). Os resultados também estão apresentados em gráficos de barras (Figura 12).

Tabela 10. Concentrações dos microelementos nas amostras de café.

Amostras	Estatística básica	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
		Cu	Zn
Barra da Estiva	Média	11,46	7,50
	DP	0,38	1,41
	CV (%)	3,35	18,82
Barra do Choça	Média	12,03	9,45
	DP	0,34	0,37
	CV (%)	2,84	3,91
Brumado	Média	9,65	8,88
	DP	0,08	0,70
	CV (%)	0,81	7,94
Ibicoara	Média	6,54	7,50
	DP	0,400	1,41
	CV (%)	6,15	18,8
Itapetinga	Média	9,68	9,34
	DP	0,06	0,80
	CV (%)	0,58	8,54
Itiruçu	Média	9,98	7,38
	DP	0,19	0,60
	CV (%)	1,93	8,18
Ituaçu	Média	6,59	8,96
	DP	0,200	0,170
	CV (%)	3,00	1,88
Maracás	Média	8,89	12,2
	DP	0,700	2,19
	CV (%)	7,87	17,9
Poções	Média	10,8	10,9
	DP	0,790	3,78
	CV (%)	7,33	34,6
Salvador	Média	15,6	16,1
	DP	0,610	3,37
	CV (%)	3,88	20,9

*n = 3; DP: Desvio padrão; CV: Coeficiente de variação.

Figura 12. Concentração de Cu e Zn nas amostras de café analisados por FAAS.



De acordo com o Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965, as quantidades máximas permitidas são de 50 µg g⁻¹ para zinco e 30 µg g⁻¹ para cobre em alimentos em geral (Brasil, 1965). Cada amostra difere uma da outra em sua composição, quesito este que pode-se levar em conta diversos fatores como solo, manejo na lavoura ou até contaminações, porém, quanto as amostras analisadas neste estudo, as concentrações de cobre tiveram médias variando entre 6,54 a 14,07 µg g⁻¹ e de zinco entre 6,82 a 11,96 µg g⁻¹, indicando que todas apresentaram valores inferiores ao valor máximo estabelecido. Os valores máximos encontrados, tanto para cobre quanto para zinco, foi da amostra coletada da cidade de Salvador-Bahia.

Segundo as análises de Santos et al. (2009) estimaram o teor de metais em duas fazendas de café no estado da Bahia e relataram valores médios de 45,4 µg g⁻¹ para zinco e 14,9 µg g⁻¹ para cobre, superiores aos encontrados na maioria das amostras analisadas neste estudo.

Resultados semelhantes ao deste estudo foram encontrados por Ashu e Chandravanshi (2011), Grembecka et al. (2007). Ashu e Chandravanshi (2011) relatou valores de cobre de 14,0 µg g⁻¹ e zinco 15,0 µg g⁻¹ e Grembecka et al (2007) também relataram valores de Cu 16,1 µg g⁻¹ e Zn 5,3 µg g⁻¹, estando os valores de concentrações cobre próximos da média encontrada na amostra de Salvador-Bahia.

Em estudo de Silva et al. (2017) o valor médio encontrado para zinco nas amostras de cafés foi de 7,61 µg g⁻¹, apresentando semelhança nos valores encontrados neste estudo. Porém, em uma das amostras apresentou concentração de zinco de 55,825 µg g⁻¹, indicando o valor superior ao definido como máximo (50 mg kg⁻¹) pela legislação brasileira (Brasil, 1965).

5. CONCLUSÕES

Por meio deste estudo foi possível aplicar um planejamento de mistura através de um procedimento de digestão estudado previamente por meio de experimentos preliminares, onde buscou-se otimizar as melhores condições dos componentes da mistura (ácido nítrico diluído, peróxido de hidrogênio e água), bem como da massa da amostra, tempo e temperatura. A digestão com ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio mostrou ser uma alternativa eficiente para a preparação de amostras de matrizes de alimentos. Além disso, bons resultados foram obtidos para precisão, exatidão e linearidade.

A aplicação de Resposta Múltipla foi necessária para otimizar concomitantemente as proporções dos reagentes usados nas digestões para Cu e Zn. Quando se avaliado graficamente pelas imagens fornecidas pelo programa Statista 12, é perceptível uma similaridade nos resultados dos sinais das absorvâncias de cobre e zinco e nas respostas múltiplas por FAAS.

Buscando-se uma validação instrumental, as respostas múltiplas das amostras analisadas no MIP OES também apresentaram similaridade com as respostas por FAAS, demonstrando que ambas as técnicas responderam de maneira semelhante, estabelecendo assim uma robustez instrumental.

Os resultados de acidez residual na sua maioria atenderam bem à extração dos analitos (com exceção de dois pontos) sem gerar uma acidez maior que 10%, uma vez que em técnicas como FAAS e MIP OES é aconselhável trabalhar com soluções com acidez inferior a esse valor.

Quando se realizou o estudo do planejamento por imagem digital, ocorreram algumas variações de sinais dos ensaios, porém novos estudos precisam ser elaborados, visando avaliar de forma mais clara como funciona a interação da luz com o meio. De qualquer forma, este estudo demonstra uma potencial via de estudos para trabalhos posteriores.

Na aplicação do método em amostras reais, as concentrações de cobre e zinco estavam dentro dos valores máximos estabelecidos pelo órgão supervisor.

6. PERSPECTIVAS

O estudo apresentou resultados significativos, validando um bom desenvolvimento do planejamento de mistura. No entanto, existem pontos a serem estudados com mais detalhes, como a abrangência de amostras de outras regiões, bem como o conhecimento da área de plantio, solo, manejo na lavoura, etc. Também caberia um estudo maior de amostragem com diversos tipos de cafés, não restringindo apenas ao café em pó.

Outra abordagem interessante seria tratar a biodisponibilidade de determinados elementos em infusões de cafés, uma vez que é comumente preparado desta forma para ser ingerido, abordando assim informações sobre toxicidade e/ou benefícios no organismo humano.

A aplicação de metodologias utilizando imagens digitais também tornou-se bastante atrativa como técnica de detecção. Desta maneira, entende-se que este estudo abrange diversos âmbitos, podendo tornar-se pesquisas futuramente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trindade, A. C., Araújo, S. A., Amorim, F. A. C., Silva, D. S., Alves, J. P. S., Trindade, J. S., ... & Bezerra, M. A. Development of a method based on slurry sampling for determining Ca, Fe, and Zn in coffee samples by flame atomic absorption spectrometry. *Food Analytical Methods*. **2020**, 13(1), 203-211.
2. Debastiani, R., Dos Santos, C. E. I., Ramos, M. M., Souza, V. S., Amaral, L., Yoneama, M. L., Dias, J. F. Elemental analysis of Brazilian coffee with ion beam techniques: From ground coffee to the final beverage. *Food Research International*. **2019**, 119, 297-304.
3. Clemente, J. M., Martinez, H. E. P., Pedrosa, A. W., Poltronieri Neves, Y., Cecon, P. R., & Jifon, J. L. Boron, copper, and zinc affect the productivity, cup quality, and chemical compounds in coffee beans. *Journal of Food Quality*, **2018**.
4. Arruda, A. C., Minim, V. P. R., Ferreira, M. A. M., Minim, L. A., Silva, N. M. D., & Soares, C. F. Coffee consumption and non-consumption justifications and motivations. *Food Science and Technology*. **2009**, 29, 754-763.
5. da Silva, C. J. R. S., Benjamim, C. J. R., Carvalho, L. B., Rocha, E. M. B., & Mori, E. Determining caffeine content in different coffee types. *Demetra: Food, Nutrition & Health/Alimentação, Nutrição & Saúde*. **2018**, 13(2).
6. Avram, O. R., Caragea, G., & Varzaru, C. A. Copper and its role in the human body—the importance of establishing copper concentrations in the body. *Romanian Journal of Military Medicine*. **2021**, 124(2), 254.
7. Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., & Schulin, R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. **2013**, 18(2), 144.
8. Dos Santos, É. J., & de Oliveira, E. Determination of mineral nutrients and toxic elements in Brazilian soluble coffee by ICP-AES. *Journal of food composition and analysis*. **2001**, 14(5), 523-531.
9. Brazil (1965) Decreto No 55871, de 26/03/1965. Modifica o Decreto No 50.040, de 24/01/1961 referente as normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto No 691, de 13/03/1962. D.O.U., Brasília, BR.

10. Liu, C., Pujol, D., Olivella, M. À., De la Torre, F., Fiol, N., Poch, J., & Villaescusa, I. The role of exhausted coffee compounds on metal ions sorption. *Water, Air, & Soil Pollution*. **2015**, 226(9), 1-10.
11. Krug, F. J., & Rocha, F. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. EditSBQ, *Sociedade Brasileira de Química*, São Paulo. **2016**, 572p.
12. Bizzi, C. A., Nóbrega, J. A., & Barin, J. S. Diluted acids in microwave-assisted wet digestion. In *Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis*. **2014**, (pp. 179-204). Elsevier.
13. Bizzi, C. A. Emprego de oxigênio e peróxido de hidrogênio como auxiliares na decomposição de amostras biológicas por via úmida assistida por radiação micro-ondas. *Tese de doutorado*, **2012**.
14. Valasques, G. S., dos Santos, A. M., Silva, D. G. D., Alves, J. P., & Bezerra, M. A. Use of constrained mixture design in the optimization of a method based on extraction induced by emulsion breaking for the determination of Ca, Mg, Mn, Fe and Zn from palm oil by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2018**, 29, 2189-2196.
15. Novaes, C. G., Yamaki, R. T., de Paula, V. F., do Nascimento Junior, B. B., Barreto, J. A., Valasques, G. S., & Bezerra, M. A. Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology-Part II: Mixture Variables. *Revista Virtual de Química*. **2018**, 10(2), 393-420.
16. Bezerra, M. A., Lemos, V. A., Novaes, C. G., de Jesus, R. M., Souza Filho, H. R., Araújo, S. A., & Alves, J. P. S. Application of mixture design in analytical chemistry. *Microchemical Journal*. **2020**, 152, 104336.
17. Todolí, J. L., & Mermet, J. M. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. **1999**, 54(6), 895-929.
18. Ashu, R., & Chandravanshi, B. S. Concentration levels of metals in commercially available Ethiopian roasted coffee powders and their infusions. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. **2011**, 25(1).
19. Gure, A., Chandravanshi, B. S., & Godeto, T. W. Assessment of metals in roasted indigenous coffee varieties of Ethiopia. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. **2018**, 32(1), 27-38.

20. Gebretsadik, A. T., Berhanu, T., & Kefarge, B. Levels of selected essential and nonessential metals in roasted coffee beans of Yirgacheffe and Sidama, Ethiopia. *Am J Environ Prot.* **2015**, 4(4), 188.
21. Gure, A., Chandravanshi, B. S., & Godeto, T. W. Metals in green coffee beans from major coffee-growing regions of Ethiopia. *Chem. Int.* **2017**, 3, 359-369.
22. Azam, K., Akhtar, S., Gong, Y. Y., Routledge, M. N., Ismail, A., Oliveira, C. A., ... & Ali, H. Evaluation of the impact of activated carbon-based filtration system on the concentration of aflatoxins and selected heavy metals in roasted coffee. *Food Control.* **2021**, 121, 107583.
23. Getachew, T., & Worku, N. Determination of essentials and toxic metals in raw and roasted coffee in Bule Hora Woreda, Borena zone, Ethiopia. *International Journal of Research (UR).* 2014, 1(11), 1386-1411.
24. Stelmach, E., Pohl, P., & Szymczycha-Madeja, A. The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew. *Food chemistry.* **2013**, 141(3), 1956-1961.
25. Albals, D., Al-Momani, I. F., Issa, R., & Yehya, A. Multi-element determination of essential and toxic metals in green and roasted coffee beans: A comparative study among different origins using ICP-MS. *Science Progress.* **2021**, 104(2), 00368504211026162.
26. Pohl, P., Stelmach, E., & Szymczycha-Madeja, A. Simplified sample treatment for the determination of total concentrations and chemical fractionation forms of Ca, Fe, Mg and Mn in soluble coffees. *Food chemistry.* **2014**, 163, 31-36.
27. Bezerra, M. A., Ferreira, S. L. C., Novaes, C. G., Dos Santos, A. M. P., Valasques, G. S., da Mata Cerqueira, U. M. F., & dos Santos Alves, J. P. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry—A review. *Talanta.* **2019**, 194, 941-959.