



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



ERICA RAINA VENÂNCIO ALMEIDA

**Utilização de ferramentas quimiométricas para otimização de
método e avaliação das concentrações de metais
em amostras de cervejas**

**JEQUIÉ - BA
FEVEREIRO/ 2024**

ERICA RAINA VENÂNCIO ALMEIDA

**Utilização de ferramentas quimiométricas para otimização de
método e avaliação das concentrações de metais
em amostras de cervejas**

Dissertação (em formato de capítulos)
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 (UESB)

JEQUIÉ - BA

FEVEREIRO/ 2024

TERMO DE APROVAÇÃO

ERICA RAINA VENÂNCIO ALMEIDA

“APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS MULTIVARIADAS PARA OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO E AVALIAÇÃO DOS TEORES DE METAIS EM AMOSTRAS DE CERVEJA”.

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

COMISSÃO EXAMINADORA



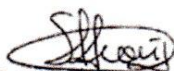
Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra
(UFBA, Salvador – BA, 2006)
(Orientador)



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



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



Prof. Dr. Sulene Alves de Araújo
(UNESP, Araraquara – SP, 2003)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em ____ / ____ / ____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e pela oportunidade de alcançar mais este objetivo. Por ter sido meu auxílio durante este tempo, em todos os momentos sei que nunca estive sozinha pois Ele esteve presente e por me abençoar colocando as pessoas certas em meu caminho durante esta jornada.

Agradeço à minha família por todo suporte e apoio durante este tempo. Aos meus pais Geraldo e Marizete por toda doação e investimento em minha formação mesmo em meio às dificuldades. Agradeço à minha tia Maria Lúcia por todo cuidado e amor comigo e tudo que já fez e faz por mim. Às minhas irmãs Rayssa e Maylane pelo amor e amizade, pelo apoio e compreensão.

Agradeço ao professor Marcos Bezerra por sua orientação, pela confiança e oportunidade de ser sua aluna e aprender com seu exemplo de profissional e ser humano. Agradeço a compreensão, paciência e apoio durante esta caminhada. Certamente sem a sua contribuição não seria possível realizar este trabalho.

À UESB pela formação de qualidade que me foi proporcionada na graduação e pós-graduação e ao Programa de Pós- Graduação em Química da UESB por todo suporte concedido aos alunos e qualidade no curso de mestrado que é oferecido.

Agradeço à Capes pela bolsa concedida durante todo período do mestrado.

Agradeço à todos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica. Ao professor Nemésio Matos agradeço o incentivo, conhecimento e experiência compartilhados durante o período de iniciação científica. À professora Sulene Araújo por todo incentivo e pelas palavras de ânimo e apoio em diversos momentos que precisei durante o mestrado, muito obrigada!

Agradeço aos meus amigos e colegas do LQA II pela amizade e toda contribuição para desenvolvimento deste trabalho em especial a Uillian, Laís, Jaqueline e Josiane. Obrigada pelo apoio e palavras de ânimo em momentos difíceis e desafiadores. Agradeço também à Felipe por sua amizade e por me ouvir quando muito precisei. À Milena por sua amizade e momentos de descontração principalmente na reta final do mestrado.

“Grandes coisas fez o Senhor por nós, pelas quais estamos alegres”

Salmos 126

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráficos de escores e seus respectivos gráficos de loadings para as combinações de componentes principais: (a) PC1 x PC2, (b) PC2 x PC3 e (c) PC1 x PC3..... 23
- Figura 2:** Matriz de distância (U-matriz) para os dados gerados pela análise elementar das amostras de cerveja. 25
- Figura 3:** (a) dendrograma obtido de análise hierárquica por agrupamento e (b) componentes do mapa neural legendados mostrando a formação de cinco grupos com suas respectivas amostras e neurônios ativos. 26
- Figura 4:** Mapas dos componentes. Os mapas mostram as contribuições de cada metal na modelagem dos dados. As cores azuladas representam baixas concentrações relativas dos metais e as cores mais avermelhadas, maiores concentrações. 26
- Figura 5:** Dendrograma aplicado sobre o mapa neural de Kohonen mostrando a formação de subgrupos sobre os cinco grupos formados. 28
- Figura 6:** Estudo da influência do tipo de ácido no sinal analítico (absorbância) no método de diluição da cerveja em meio ácido. Condições experimentais: concentração dos ácidos $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de sonicação 20 min..... 36
- Figura 7:** Perfis de desejabilidade obtidas pelo ajuste de uma função quadrática aos dados de absorbância obtidos pela aplicação do planejamento Doehlert. 39
- Figura 8:** Duas superfícies de respostas parciais obtidas pelo ajuste de uma função quadrática aos dados obtidos pela aplicação do planejamento Doehlert. (a) CA versus TS e (b) CS versus TS..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de nutrientes e minerais em cervejas tipo pilsen e sem álcool de acordo com a TBCA.....	2
Tabela 2: Características analíticas do método aplicado na determinação de metais nas amostras de cerveja após decomposição em bloco digestor.....	15
Tabela 3: Concentrações de metais (mg L^{-1}) em diferentes tipos de cervejas.	17
Tabela 4: Valores de loadings para as três primeiras componentes principais.	22
Tabela 5: Matriz de planejamento Doehlert e respostas para otimização das variáveis envolvidas no desempenho da diluição de amostras de cerveja em meio ácido visando a determinação de metais por FAAS/FAES.	38
Tabela 6: Parâmetros das curvas analíticas para Ca, Cu, Fe, Mn e Zn obtidas em meio aquoso acidificado e por adição padrão no mix da amostra dissolvida em meio ácido.	42
Tabela 7: Alguns parâmetros analíticos de mérito obtidos para o método desenvolvido.	43
Tabela 8: Resultados dos testes de adição/recuperação (teste spike) para dois níveis de concentração ($0,5$ e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$) no mix das amostras de cervejas tratadas pelo método da diluição em meio ácido.	44
Tabela 9: Resultados (mg L^{-1}) para determinação de metais ($N = 3$) em amostras de cervejas e comparação com duas metodologias.	45

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANN – Rede neural artificial (do inglês: *artificial neural networks*)

DG – Desejabilidade global

EQ- Erro de quantização

ET- Erro topológico

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês: *flame atomic absorption spectrometry*)

FAES – Espectrometria de emissão atômica com chama (do inglês: *flame atomic emission spectrometry*)

GC-MS- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês: *gas chromatography – mass spectrometry*)

GFAAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, (do inglês: *graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

HCA – Análise por agrupamento hierárquico (do inglês: *hierarchical clustering analysis*)

ICP OES – Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (do inglês: *inductively coupled plasma optical emission spectrometer*)

LDA- Análise discriminante linear (do inglês: *linear discriminant analysis*)

LD - Limite de detecção (do inglês: *limit of detection*)

LQ - Limite de quantificação (do inglês: *limit of quantification*)

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

MIP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (do inglês *microwave-induced plasma optical emission spectrometry*)

PCA – Análise de Componentes Principais (do inglês: *principal component analysis*)

PCs – Componentes principais (do inglês: *principal component*)

RSD- desvio padrão relativo (do inglês: *relative standard deviation*)

SOM - Mapa auto-organizável (do inglês: *self-organizing map*)

TS-FF-AAS - Espectrometria de Absorção Atômica em Forno Termospray (do inglês: *Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry*)

TXRF - Fluorescência de raios X por reflexão total (do inglês: *total reflection X-Ray fluorescence*)

Utilização de ferramentas quimiométricas para otimização de método e avaliação das concentrações de metais em amostras de cervejas

Autora: Erica Raina Venâncio Almeida

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

RESUMO:

A cerveja é uma bebida alcoólica consumida ao redor de todo mundo. É fonte de diversos nutrientes e, consequentemente possui propriedades antioxidantes sendo benéfica se consumida moderadamente. Nesta dissertação foram realizados dois trabalhos usando-se a técnica espectrométrica de absorção atômica com chama para determinação de Ca, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn e de emissão atômica com chama para determinar Na e K em amostras de cerveja. No primeiro, utilizou-se Análise de Componentes Principais (PCA) e Mapas Auto-organizáveis de Kohonen (KSOM's) na exploração dos dados originados da análise de amostras de cervejas de diferentes tipos (pilsen, lager, malte, sem álcool e Malzbier) e marcas, sendo os teores de metais foram determinados após decomposição em bloco digestor. Os resultados para as duas técnicas utilizadas não mostraram agrupamento das amostras de acordo com seu tipo ou com sua marca provavelmente devido a variabilidade das concentrações dos metais ser muito grande e depender principalmente da matéria prima utilizada (um fator inconstante). No entanto, a técnica de PCA mostrou uma tendência ao agrupamento de dois grupos de cerveja (malzbier e sem álcool). No segundo trabalho, desenvolveu-se um método para preparo de amostras de cervejas utilizando a técnica de diluição em meio ácido assistida por energia de ultrassom, o procedimento analítico foi otimizado aplicando-se planejamento Doehlert e função de desejabilidade. A metodologia desenvolvida apresentou limites de quantificação (mg L^{-1}) de 0,25; 0,073; 0,12; 0,36; 0,038; 0,13; 0,14, e precisão (%RSD, 0,5 mg L^{-1} , repetibilidade) de 4,2; 2,8; 2,7; 4,1; 4,0; 3,8; 2,3% para Ca, Cu, Fe, K, Mn, Na e Zn, respectivamente. A exatidão foi avaliada por meio da comparação com um método padrão (decomposição em bloco digestor) e por testes de adição/recuperação dos analitos nas amostras diluídas (testes spikes) fornecendo recuperações entre 90 e 113%.

Palavras-chave: cervejas, metais, análise multivariada, planejamento Doehlert, FAAS, FAES.

Use of chemometric tools to optimize method and evaluate metal concentrations in beer samples

Author: Erica Raina Venâncio Almeida

Advisor: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

ABSTRACT:

Beer is an alcoholic beverage consumed worldwide. It is a source of several nutrients and, consequently, has antioxidant properties and is beneficial if consumed in moderation. In this dissertation, two studies were carried out using the flame atomic absorption spectrometric technique to determine Ca, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn and flame atomic emission to determine Na and K in beer samples. In the first, Principal Component Analysis (PCA) and Kohonen Self-Organizing Maps (KSOMs) were used to explore data originating from the analysis of beer samples of different types (pilsner, lager, malt, non-alcoholic and Malzbier) and brands, with metal contents being determined after decomposition in a digestion block. The results for the two techniques used did not show grouping of samples according to their type or brand, probably because the variability of metal concentrations is very large and depends mainly on the raw material used (an inconstant factor). However, the PCA technique showed a tendency to group two groups of beers (malzbier and non-alcoholic). In the second work, a method was developed for preparing beer samples using the dilution technique in acidic medium assisted by ultrasound energy, the analytical procedure was optimized by applying Doehlert planning and desirability function. The developed methodology presented quantification limits (mg L^{-1}) of 0.25; 0.073; 0.12; 0.36; 0.038; 0.13; 0.14, and precision (%RSD, 0.5 mg L^{-1} , repeatability) of 4.2; 2.8; 2.7; 4.1; 4.0; 3.8; 2.3% for Ca, Cu, Fe, K, Mn, Na and Zn, respectively. Accuracy was assessed by comparison with a standard method (digester block decomposition) and by addition/recovery tests of analytes in diluted samples (spike tests) providing recoveries between 90 and 113%.

Keywords: beers, metals, multivariate analysis, Doehlert design, FAAS, FAES

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de dissertação foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica II da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Jequié. As análises utilizando as técnicas de espectrometria de absorção e emissão atômica na chama (FAAS e FAES) foram realizadas no Laboratório de Química Analítica I coordenado pelo Prof. Valfredo Lemos com auxílio do técnico Márcio José, e dos colegas Rosivan Assis e Anderson Mello. 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 dos capítulos seguiu as instruções do periódico *Food Chemistry*, para submissão após as alterações sugeridas pela banca examinadora. O Periódico é enquadrado como estrato A1 na CAPES e Fator de Impacto de 8,8 (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>.

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Objetivo geral.....	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. CAPÍTULO 1.....	7
3.1. Introdução	8
3.2. Experimental	11
3.2.1. Instrumentação	11
3.2.2. Reagentes e soluções	11
3.2.3. Aquisição das amostras	12
3.2.4. Decomposição ácida em bloco digestor.....	12
3.2.5. Tratamento dos dados	13
3.3 Resultados e discussão	13
3.3.1. Características analíticas.....	13
3.3.2. Concentrações de metais nas amostras de cerveja	16
3.4. Análise multivariada.....	21
3.4.1. Análise de componentes principais.....	21
3.4.2. Mapas auto-organizáveis de Kohonen.....	24
3.5. Conclusões	28
4. CAPÍTULO 2.....	29
4.1. Introdução	30
4.2. Experimental	32
4.2.1. Instrumentação	32
4.2.2. Reagentes e soluções	32
4.2.3. Aquisição das amostras	33
4.2.4. Otimização do método	33

4.2.5. Decomposição ácida em bloco digestor.....	34
4.2.6. Método de preparo da amostra obtido após processo de otimização	34
4.3. Resultados e discussão	34
4.3.1. Estudo do tipo de ácido	34
4.3.2. Otimização do procedimento por matriz Doehlert	37
4.3.3. Avaliação de efeitos de matriz.....	40
4.3.4. Avaliação do desempenho do método de diluição em meio ácido e aplicação nas amostras de cervejas	42
4.4. Conclusões do capítulo	46
5. CONCLUSÕES GERAIS	47
ANEXOS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. REFERENCIAL TEÓRICO

A cerveja é uma das bebidas fermentadas mais antigas [1] e se encontra entre as bebidas alcoólicas mais populares e consumidas no mundo [2]. O nível de aceitação e consumo da cerveja entre os brasileiros são demonstrados em dados estatísticos do Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA os quais revelam que no ano de 2022, 180 novas cervejarias foram registradas no Brasil, considerando que comparando com dados do ano de 2021, não houve diminuição no número de estabelecimentos ativos em nenhum estado [3].

Conforme o Artigo 2º da Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019, “cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, sendo que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” [4].

A cerveja é uma bebida rica em substâncias e compostos bioquímicos que são benéficos para a saúde do ser humano entre eles vitaminas, minerais, proteínas, aminoácidos essenciais, polipeptídios, polifenóis, óleos essenciais e fibras solúveis. Dessa forma, o consumo moderado desta bebida pode contribuir positivamente para a saúde dos seus consumidores prevenindo doenças como câncer, osteoporose, doenças cardiovasculares, uma vez que os compostos bioativos presentes em sua composição possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias [5].

A composição química da cerveja pode ser resultante tanto dos compostos provenientes da matéria prima utilizada para produção da bebida, como também daqueles que são formados no decorrer do processo de fabricação [6]. Metais presentes na cerveja são provenientes de forma majoritária da matéria prima (fonte endógena), e, portanto, seus teores são um reflexo da composição dos ingredientes utilizados. A presença e concentração destes elementos varia de acordo com o tipo de cerveja produzida, a qualidade dos substratos que são utilizados e do país de origem da bebida. Sendo assim, aspectos morfológicos, climáticos e geológicos do local onde foram cultivados esses ingredientes, os

tipos de cultivo e manejo do solo podem influenciar diretamente na composição química elementar da cerveja produzida [7].

Metais em cervejas podem ser provenientes também de fontes exógenas, seja por meio de outras substâncias, além da matéria prima, as quais são adicionadas no decorrer do processo de fabricação com a finalidade de controlar as fases de fermentação e maturação, ou mesmo, por contaminação dos equipamentos da cervejaria utilizados no manuseio e armazenamento da bebida [7].

A avaliação do teor mineral na cerveja (sobretudo de metais em quantidades macro, micro e traços) é de grande importância devido a influência destes em sua composição nutricional. A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA) contém informações sobre a composição destes minerais na cerveja em mg por 100g da bebida tipo pilsen e sem álcool [8]. Os dados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Composição de nutrientes e minerais em cervejas tipo pilsen e sem álcool de acordo com a TBCA.

Nutriente	Cerveja Pilsen*	Cerveja sem álcool*
Cálcio	4,99	7,00
Ferro	Traço	0,06
Cobre	Traço	0,01
Manganês	0,01	0,01
Zinco	Traço	0,02
Sódio	4,23	13,0
Potássio	29,5	8,00

Fonte: Adaptado de TBCA [8]

*(mg/100 g de cerveja)

A importância destes metais é refletida também no processo de fabricação e na qualidade do produto uma vez que muitos desses elementos estão envolvidos em diferentes reações no decorrer deste processo, sobretudo na fermentação e, suas concentrações podem influenciar nas características do mosto afetando significativamente na qualidade da bebida, na estabilidade do sabor e da espuma [7,9,10,11].

Alguns metais são cofatores essenciais para muitas enzimas fermentativas e, portanto, são componentes indispensáveis cumprindo funções estruturais ou de equilíbrio de cargas. Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn são alguns dos metais que em baixas concentrações são necessários para o crescimento adequado das leveduras, porém, em concentrações elevadas se tornam tóxicos podendo gerar um estresse salino nas mesmas, como acontece com o Na [7].

Ca e Mg afetam no processo de isomerização de compostos do lúpulo, ou seja, na transformação de α -ácidos em iso α -ácidos, compostos responsáveis pelo amargor na cerveja e formação de espuma. Cu e Fe atuam como catalisadores em reações que promovem a oxidação de compostos orgânicos responsáveis por conferir estabilidade no sabor, o que contribui para o envelhecimento da cerveja. Estes metais também podem favorecer a formação de compostos voláteis de enxofre os quais são responsáveis por prejudicar a qualidade do sabor e estabilidade da bebida [6,12].

Em contrapartida, o Fe pode influenciar também de maneira positiva no processo de fabricação pois contribui para o crescimento e desenvolvimento da levedura, aumentando a estabilidade da espuma e no metabolismo da glicose e ativação ou inibição de enzimas. Fe e Mn atuam na ativação e inibição de diferentes enzimas e podem influenciar no processo de fabricação da cerveja [6,12]. Sendo assim, as concentrações destes metais devem ser monitoradas durante o processo de fermentação [7].

De maneira geral, as cervejas são classificadas em dois grandes grupos de acordo com o tipo de fermentação sendo eles: ale e lager. As cervejas tipo ale são chamadas de cerveja de alta fermentação produzidas com leveduras que atuam na superfície do líquido sob altas temperaturas (12 a 25 °C), as cervejas resultantes desse processo de fermentação possuem aromas mais frutados e perfumados em comparação com as cervejas tipo lager. Estas por sua vez, são resultantes do processo de fermentação que ocorre a baixas temperaturas (3,3 a 13 °C) neste caso, as leveduras agem na parte inferior do tanque de fermentação [13,14,15].

A família lager teve sua origem na Alemanha, na região da Baviera, no século XIX e nos dias de hoje é o tipo de cerveja mais consumido mundialmente [26]. Os aromas e sabores das cervejas lager são mais suaves e leves em

comparação com as cervejas do tipo ale. O estilo pilsen largamente apreciada no Brasil é uma lager, obtida a partir do malte tipo pilsen utilizando água de baixa dureza, possui um sabor suave, é clara e límpida [16].

A cerveja sem álcool pode ser produzida de diferentes formas. Utilizando-se técnicas físicas o álcool é removido após o fim do processo de fermentação, enquanto por meio de técnicas biológicas o desenvolvimento do álcool é inibido ou controlado durante o processo de fermentação para que não ultrapasse a porcentagem de teor alcoólico estabelecido para cerveja sem álcool, neste caso, a fermentação da cerveja é interrompida por processos de filtração e pasteurização. Outro método constitui-se em realizar a adição de microrganismos especiais, leveduras não *Saccharomyces*, que possuem capacidade limitada ou nenhuma capacidade de fermentar maltose ou maltotriose que compõe a maior fração de açúcar do malte [14,17].

No Brasil “cerveja sem álcool” ou “desalcoholizada” é classificada como a cerveja que possui o conteúdo alcoólico inferior ou igual a 0,5% v/v, enquanto que “cerveja com baixo teor alcoólico” é aquela na qual a quantidade de álcool encontra-se entre 0,5 e 2,0 % v/v e, “cerveja” quando o teor alcoólico é maior que 2,0% em volume [4].

A Malzbier originada na cidade de Einbeck na Alemanha [29] é um estilo de cerveja de baixa fermentação e é caracterizada por sua coloração escura. Grandes quantidades de açúcares ou xaropes são adicionados ao mosto após este passar pelos processos de fermentação e filtração. As cervejas Malzbier produzidas e comercializadas no Brasil, são adicionadas de corante caramelo e açúcar de cana responsáveis por conferir o sabor adocicado à cerveja [18]. Já a cerveja “puro malte” é a cerveja produzida a partir do mosto cujo extrato é oriundo exclusivamente de cevada malteada ou de extrato de malte [4].

Diante da grande quantidade de metais presentes na cerveja e de sua importância tanto na saúde do ser humano quanto na qualidade da bebida, considera-se importante o desenvolvimento de estudos para determinar e avaliar do teor de macro e microelementos em sua composição. Contudo, devido à diversidade de tipos e marcas de cerveja existentes, essas análises resultam em uma ampla quantidade de dados, sendo assim, torna-se de grande interesse a

aplicação de técnicas que permitam uma melhor interpretação dos dados obtidos.

A estatística multivariada tem sido utilizada frequentemente no tratamento de dados analíticos e permite por meio de suas ferramentas computacionais tratar esses dados identificando similaridades entre as amostras, o que corresponde às semelhanças existentes em suas composições químicas [19]. A análise de componentes principais (Principal Components Analysis - PCA) é uma das técnicas de reconhecimento de padrões mais utilizadas para esta finalidade pois reduz a dimensionalidade dos dados preservando ao máximo as suas informações estatísticas referentes à amostra. A PCA é realizada através do estabelecimento de novas variáveis chamadas de componentes principais (PCs), as quais são combinações lineares das variáveis originais sendo organizadas em ordem decrescente de importância [20].

As redes de Kohonen é um tipo de Rede Neural Artificial (ANN), constitui-se em um modelo matemático computacional inspirado no funcionamento de células neurais biológicas. Foram desenvolvidas por Teuvo Kohonen na década de 80. Essas redes convertem as relações não-lineares dos dados de entrada em relações geométricas simples, que consiste em uma grade ou reticulado bidimensional, também denominado de mapas auto-organizáveis de Kohonen ou Self Organizing Maps (SOM) ou (KSOMs) [21,22].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Aplicar ferramentas quimiométricas na análise multivariada de dados e no desenvolvimento de um novo método analítico para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mn, Na e Zn em amostras de cerveja industriais de diversas marcas e tipos utilizando espectrometria de absorção/emissão atômica por chama (FAAS/FAES).

2.2. Objetivos específicos

- Utilizar as técnicas de Análise de Componentes Principais e Mapas Auto-organizáveis de Kohonen no tratamento dos dados obtidos da determinação de metais por FAAS e FAES após decomposição por via úmida em bloco digestor;
- Aplicar planejamento experimental Doehlert e função desejabilidade na otimização de método analítico utilizando técnica de diluição em meio ácido assistida por energia de ultrassom;
- Avaliar o desempenho do método analítico desenvolvido;
- Aplicar a metodologia em amostras de cervejas adquiridas em supermercados da cidade de Jequié – BA;

3. CAPÍTULO 1

Aplicação de análise de componentes principais e mapas auto-organizáveis de Kohonen na avaliação de metais macro e micronutrientes em diferentes tipos de amostras de cerveja

3.1. Introdução

A cerveja é uma bebida largamente apreciada pela população. No ano de 2021, foram consumidos mundialmente aproximadamente 186 milhões de quilolitros desta bebida, sendo a China, Estados Unidos e Brasil, nesta ordem, os países que mais consomem cerveja no mundo [23]. A cerveja é fabricada a partir da fermentação de cereais (normalmente de malte de cevada, com ou sem materiais ricos em amido) por ação de leveduras específicas e aromatizada por lúpulo. É uma fonte nutricional de minerais, de elementos macro e micronutrientes, de compostos polifenólicos, de vitaminas e fibras. Esta bebida possui propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antimutagênicas e angiogênicas, sendo benéfica se consumida moderadamente [24].

A presença de metais na cerveja pode ser proveniente de fontes naturais como do solo no qual o cereal foi plantado, da água usada na produção da bebida, das próprias matérias primas, ou também da contaminação ambiental, da contaminação por fertilizantes e pesticidas, do processo industrial de fabricação ou das embalagens utilizadas no seu armazenamento. Sendo assim, a determinação rotineira desses metais assume grande importância, considerando-se que estes influenciam nas características da cerveja e da qualidade do produto final [25].

Metais em quantidades macro, micro e traço apresentam importante papel nos processos que envolvem a fermentação, devido ao fato de fornecerem um ambiente adequado para o crescimento das leveduras. Sabe-se que esses metais são necessários, mesmo em quantidades traço, pois agem como cofatores fundamentais para a ação efetiva de diferentes enzimas que agem no metabolismo e crescimento das leveduras. A depender da concentração, a presença de metais de transição em cervejas, tais como Fe e Cu em suas formas livres (não complexadas) contribuem para a catálise de reações de degradação/produção de substâncias associadas com a qualidade da cerveja afetando seu tempo de armazenamento. Espécies reativas de oxigênio formadas, tais como radicais livres, oxidam diversos compostos orgânicos presentes na cerveja afetando sua estabilidade e sabor. Por outro lado, os metais apresentam importância nutricional para os consumidores dessa bebida, porém, o efeito benéfico no metabolismo e na saúde do consumidor depende do tipo de

espécie metálica presente, uma vez que algumas espécies orgânicas se ligam aos íons metálicos e formam complexos de diferentes estabilidade e disponibilidade ao organismo [26].

As técnicas de análise multivariada permitem a extração de informações latentes de um grande conjunto de dados. Uma das técnicas multivariadas mais difundidas é a análise de componentes principais. Esta é uma técnica de exploração de dados usada para reconhecimento de padrões dos objetos (ex: as amostras) com base em alguma propriedade medida (ex: concentração de metais). Os componentes principais são combinações lineares das variáveis originais que conseguem explicar ao máximo a variância dos dados. A ideia principal é fornecer uma forma de extrair informações usando apenas poucos componentes principais [27,28,29,30].

PCA tem sido usada na área de alimentos para, por exemplo: detecção precoce de mofo em queijos a partir de dados hiperespectrais [31], estudos das propriedades organolépticas de produtos alimentícios derivados de ovo fresco e ovo em pó [32], determinação da origem vegetal do extrato de óleo de alcaçuz usado como um aditivo alimentar natural [33], associação multivariada entre compostos bioativos e propriedades funcionais em alimentos [34], avaliação da relação sinal-ruído para calibração de analisadores espectrofotométricos de alimentos [35], investigação da distribuição de 17 aminoácidos em gelatinas de origem bovina e porcina após análise por ultra cromatografia líquida de alto desempenho com detector por arranjo de diodos [36], investigação de diferenças nas propriedades físicas e químicas entre cinco variedades de morango [37], entre outras aplicações.

Os mapas auto-organizáveis de Kohonen é uma aplicação das redes neurais artificiais que tem sido usada como ferramenta multivariada de exploração de dados. Esta abordagem é considerada relativamente simples e se baseia em gerar mapeamentos de um espaço de dimensão elevada na forma de estruturas cuja dimensão topológica é mais simples que a original. Estes mapas são capazes de preservar as relações de vizinhança dos dados de entrada enquanto a dimensionalidade dos dados é diminuída. Isto os torna interessantes para aplicações em diversas áreas, incluindo a análise exploratória de dados. KSOMs fazem parte de um grupo de redes neurais chamado redes baseadas

em modelos de competição. Estas redes combinam competição com uma forma de aprendizagem para fazer os ajustes de seus pesos, buscando encontrar similaridades baseando-se apenas nos padrões de entrada. O principal objetivo dos mapas auto-organizáveis de Kohonen é agrupar os dados de entrada que são semelhantes entre si formando classes ou agrupamentos.

KSOMs tem sido aplicado na área de alimentos para realizar a triagem do teor de metais obtidas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) em cascas, polpas e sementes de duas espécies de maracujá (*Passiflora L.*) [38], desenvolver uma metodologia para avaliação sensorial de produtos alimentares com base em tributos como aroma, flavor, aparência e textura [39], avaliação de refrigerantes de diversas marcas e sabores através da determinação de nove elementos por ICP OES [40], avaliação da contaminação de embalagens de brotos de alface por *Salmonella Typhimurium* [41], investigação da adulteração de óleos essenciais usando a matriz formada pelo espectro de excitação-emissão de fluorescência para diferenciar óleos puros de óleos adulterados [42], classificar geograficamente vinhos eslovenos com base em sua composição elementar [43], classificar amostras de diversas variedades de morango com base na sua composição química de espécies voláteis determinadas após micro extração em fase sólida na modalidade headspace e determinação por GC-MS [44], entre outros.

Neste trabalho, duas técnicas de análise multivariada de dados (Análise de componentes principais e Mapas Auto-organizáveis de Kohonen) foram empregadas na exploração de dados provenientes da determinação de metais em amostras de cervejas de diferentes tipos (puro malte, lager, pilsen, malzbier, sem álcool) e marcas. As determinações dos metais foram realizadas usando as técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) para determinação dos metais Ca, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn e emissão atômica com chama (FAES) para determinação de Na e K.

3.2. Experimental

3.2.1. Instrumentação

Para determinação dos metais nos digeridos das amostras de cerveja, usou-se um espectrômetro de absorção atômica com chama da Perkin Elmer (Modelo Analyst 200, Norwalk, CT, Estados Unidos) operando no modo emissão (para determinação de Na e K) e no modo de absorção (para os demais metais). O espectrômetro é equipado com lâmpada de deutério, para correção de radiação fundo emitida pelo atomizador, e lâmpadas de cátodo oco operando nos seguintes comprimentos de onda (nm) para determinação dos metais de interesse: Ca (422.7), Cu (324.7), Fe (248.3), Mn (279.5), Ni (232.0), e Zn (213.9). No modo emissão não foi necessário lâmpadas, mas o próprio elemento, excitado na chama, foi usado como fonte de radiação medida nos seguintes comprimentos de onda (nm): K (766.5) e Na (589.0). A chama foi composta por uma mistura de ar ($2,0 \text{ L min}^{-1}$) e acetileno ($13,5 \text{ L min}^{-1}$). A razão de fluxo de aspiração da amostra pelo nebulizador usada foi de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Para a digestão das amostras utilizou-se um bloco digestor da Tecnal (Modelo TE 0851, Piracicaba, São Paulo, Brasil), equipado com módulo de programação de aquecimento, tubos digestores e dedos frios de vidro. Este bloco apresenta 40 cavidades para encaixe dos tubos digestores o que corresponde a mesma quantidade de amostras que podem ser decompostas. Água deionizada foi obtida de um sistema de purificação Permutation (Labnorte, Salvador, Brasil).

3.2.2. Reagentes e soluções

Ácido nítrico concentrado Neon (Suzano, São Paulo, Brasil) e peróxido de hidrogênio 35% Neon (Suzano, São Paulo, Brasil) foram utilizados para decomposição das amostras de cerveja. As vidrarias usadas no preparo de soluções, os recipientes de decomposição e frascos de polietileno utilizados para armazenagem dos digeridos, foram descontaminados antes do uso com solução de ácido nítrico 5% ($v v^{-1}$) por no mínimo 12 horas. Depois, este material foi enxaguado com água deionizada e secos em ambiente livre de poeira. Soluções padrão de metais (Ca, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, Na e K) usados para a construção de

curvas de calibração e nos testes spike foram preparadas por diluição de suas respectivas soluções estoques (Merck, Darmstadt, Alemanha) cujas concentrações eram 1000 mg mL^{-1} conservadas em ácido clorídrico 1% (v v⁻¹).

3.2.3. Aquisição das amostras

As amostras de cerveja foram compradas em supermercados da cidade de Jequié (Bahia/Brasil). Foram adquiridas cervejas de diferentes tipos: pilsen (7 amostras), lager (14 amostras), puro malte (10 amostras), sem álcool (9 amostras) e malzbier (6 amostras) sendo 43 das amostras armazenadas em embalagens de lata e 4 amostras eram contidas em embalagens de vidro. As amostras foram transportadas do supermercado até o laboratório e armazenadas em armário fechado para não sofrerem influência da luz, sem a necessidade de refrigeração. As amostras eram abertas apenas no momento do tratamento.

3.2.4. Decomposição ácida em bloco digestor

Para realizar a decomposição, transferiu-se 10,0 mL de cada amostra de cerveja previamente desgaseificada (utilizando-se banho ultrassônico) para tubos digestores de vidro já posicionados no bloco digestor. Em seguida, acrescentou-se 5,0 mL de ácido nítrico concentrado e 2,0 mL de peróxido de hidrogênio a cada tubo contendo as amostras. Acoplou-se o dedo frio e realizou-se o aquecimento e decomposição simultânea das amostras (em triplicata) a uma temperatura de 120 °C. Após haver a liberação de um vapor de cor castanha e as amostras apresentarem uma coloração clara, manteve-se o aquecimento até quase secura para liberar excesso de ácido e então, finalizou-se o aquecimento. Após o processo de decomposição aguardou-se as amostras atingirem a temperatura ambiente e em seguida foi realizada a transferência quantitativa para tubos tipo Falcon (lavou-se o frasco de decomposição três vezes, adicionando a água de lavagem à solução final), completou-se o volume para 25 mL com água deionizada, armazenando os digeridos na geladeira até o momento da análise.

3.2.5. Tratamento dos dados

Os dados de concentração dos metais determinados foram organizados em uma matriz composta por 47 linhas (amostras de cerveja) e 8 colunas (analitos determinados). Para a aplicação da PCA, os dados foram previamente auto escalonados subtraindo-se a média da coluna e dividindo-se pelo seu desvio padrão. Os dados foram tratados usando-se o software Statistica (The StatSoft, Inc, Tulsa, OK, Estados Unidos) versão 7.0.

O software Matlab R2016a (The MathWorks, Co, Natick, MA, Estados Unidos) munido com a toolbox disponível no site www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox foi utilizado para implementar, treinar e gerar os mapas auto-organizáveis de Kohonen. O código de implementação foi elaborado a partir de algoritmos sugeridos na literatura [45]. O conjunto de dados foi organizado em uma matriz (47 x 8), com as amostras organizadas em linhas e as variáveis em colunas. Os dados foram previamente autoescalados. O número total de neurônios utilizados no mapa foi definido pela fórmula $5\sqrt{n}$, onde n é o número total de amostras usando o mapa tipo folha e a grade hexagonal [46]. O KSOM foi treinado com o conjunto de grupos de dados de entrada utilizando um algoritmo de treinamento no qual todo o conjunto é apresentado ao mapa antes de qualquer ajuste. A função que limitou a vizinhança utilizada no treinamento da plataforma e na estrutura da rede foi hexagonal. A arquitetura da rede foi determinada empiricamente, com base em índices qualitativos como erro de quantização (EQ) e erro topológico (ET). Os resultados que foram processados neste trabalho foram os dados correspondentes às concentrações dos metais determinados nas amostras de cerveja.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1. Características analíticas

O método utilizado para a determinação dos metais nas amostras de cervejas foi validado para comprovação de sua aplicabilidade. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão (repetitividade) e linearidade foram determinados segundo as recomendações dos guias disponíveis na literatura [47]. Os seus valores são apresentados na Tabela 2. A exatidão do método foi

avaliada por meio de testes spike em dois níveis de concentrações (0,5 e 1,5 mg L⁻¹) obtendo-se recuperações entre 96 e 108%.

Tabela 2: Características analíticas do método aplicado na determinação de metais nas amostras de cerveja após decomposição em bloco digestor.

Metal	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)	Curva analítica	Precisão (% RSD) *	Linearidade (R²)
Ca	0,088	0,29	$y = 0,0032x + 0,0013$	4,2	0,9978
Cu	0,0075	0,025	$y = 0,0667x + 0,0048$	2,8	0,9986
Fe	0,036	0,12	$y = 0,0494x + 0,0056$	2,1	0,9995
Mn	0,012	0,039	$y = 0,0275x + 0,0027$	3,5	0,9986
Ni	0,0084	0,028	$y = 0,0671x + 0,0052$	3,1	0,9981
Zn	0,0056	0,018	$y = 0,3739x + 0,0059$	2,5	0,9993
Na	0,015	0,051	$y = 698,2x + 894$	3,2	0,9907
K	0,021	0,070	$y = 709,9x + 742$	3,8	0,9931

*Para uma solução de concentração 0,5 mg L⁻¹ (N=10)

3.3.2. Concentrações de metais nas amostras de cerveja

As amostras digeridas foram analisadas usando um espectrômetro de absorção/emissão atômica com chama. As variações de concentrações de Ca, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, Na e K nas amostras de cerveja foram as seguintes (mg L^{-1}): 5,56 a 50,9 (Ca); 0,0316 a 0,202 (Cu); 0,107 a 0,636 (Fe); 0,0130 a 0,365 (Mn); <LQ a 0,164 (Ni); 0,0746 a 1,35 (Zn); 0,364 a 218 (Na) e 76,4 a 731 (K). As variações nas concentrações dos metais, com relação ao tipo de cerveja, são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações de metais (mg L⁻¹) em diferentes tipos de cervejas.

	Ca	Cu	Fe	Zn	Mn	Ni	Na	K
Pilsen								
Faixa	4,40 a 51,0	0,0316 a 0,128	0,107 a 0,302	0,0745 a 0,241	<LQ a 0,168	<LQ a 0,140	47,14 a 155,3	76,41 a 229,3
Média	23,2	0,0824	0,174	0,134	0,0817	0,0667	85,7	150
DP	16	0,032	0,084	0,066	0,054	0,051	36	58
Malzbier								
Faixa	10,4 a 34,5	0,113 a 0,179	0,165 a 1,084	0,0858 a 0,767	0,0846 a 0,232	<LQ a 0,164	15,3 a 177	62,6 a 456
Média	23,3	0,142	0,489	0,438	0,157	0,0855	84,8	196
DP	9,1	0,022	0,34	0,30	0,058	0,056	62	136
Lager								
Faixa	5,82 a 43,3	0,0714 a 0,152	0,182 a 0,550	0,990 a 1,350	<LQ a 0,277	<LQ a 0,137	<LQ a 217	176 a 513
Média	19,2	0,120	0,279	0,244	0,135	0,0718	69,6	386
DP	9,4	0,026	0,12	0,32	0,080	0,057	65	101
Sem álcool								
Faixa	5,65 a 34,0	0,0728 a 0,094	0,113 a 0,561	0,0756 a 0,157	0,0123 a 0,181	<LQ a 0,128	<LQ a 146	190 a 490
Média	11,5	0,0812	0,205	0,0957	0,0959	0,0711	102	328
DP	8,8	0,0062	0,14	0,029	0,071	0,053	51	98
PM								
Faixa	3,80 a 39,3	0,0837 a 0,282	0,138 a 0,724	0,0923 a 0,604	0,0314 a 0,365	<LQ a 0,161	<LQ a 121	335 a 731
Média	19,5	0,159	0,283	0,193	0,170	0,0678	61,1	458
DP	11	0,053	0,19	0,16	0,11	0,061	38	142

DP: desvio padrão; PM: Puro Malte.

Notou-se, neste estudo, que as amostras de cerveja tipo Malzbier apresentaram as maiores concentrações médias dos metais Fe, Zn e Ni. Os maiores teores médios de Ca foram encontrados nas cervejas Malzbier e Pilsen com médias 23,3 e 23,2 (mg L⁻¹), respectivamente. As cervejas do tipo puro malte apresentaram maiores médias de concentração para Cu, Mn e K.

A Malzbier é uma cerveja adocicada, escura, de baixo teor alcoólico e se popularizou quando começou a ser indicada como uma opção para mulheres em fase de amamentação, trabalhadores e pessoas com anemia e baixa imunidade [18,48]. A levedura usada na bebida tem um elevado teor de nutrientes, minerais e proteínas. Por isso, muitos estudiosos acreditavam que esta cerveja era capaz de combater a anemia, sendo também rica em ácido fólico. A bebida chegou a ser indicada como suplemento alimentar. Essas características podem explicar os maiores teores de metais encontradas neste estudo para este tipo de cerveja.

Percebe-se que as cervejas sem álcool apresentaram maiores médias para o Na. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, Na, dentre os metais estudados nesta pesquisa, é o que está presente em maior quantidade na cerveja sem álcool (13,0 mg L⁻¹) como mostrado na Tabela 1.

A cerveja sem álcool tradicionalmente, é fabricada com ingredientes naturais, sendo livre de açúcar adicionado, adoçantes artificiais e corantes ou conservantes, por isso, apresenta menor teor de carboidrato e, consequentemente, calorias, quando comparada com outros tipos de cerveja. A retirada do álcool pode ser realizada por evaporação após a etapa de fermentação da bebida, mantendo-se os nutrientes provenientes dos ingredientes originais, de outro modo, por meio de técnicas biológicas, o desenvolvimento do álcool é interrompido ou controlado durante o processo, neste caso, a cerveja apresenta elevado extrato residual [17].

Consequentemente este tipo de cerveja pode apresentar uma maior concentração de minerais como mostra dados da TBCA (Tabela 1) quando comparada à cerveja tipo pilsen [19,20]. No entanto, neste trabalho somente para Fe, K, Mn e Na foram apresentadas maiores médias de concentrações quando comparadas com o grupo de cervejas pilsen. Os rótulos de algumas cervejas sem álcool analisadas informavam a presença de adjunto como milho e açúcar de cana nos ingredientes de algumas das cervejas zero álcool.

A cerveja Puro Malte é fabricada apenas com água, lúpulo, malte de cevada e a levedura, sem nenhum outro tipo de adjunto. Por isso, a puro malte vai ter uma maior possibilidade de apresentar uma qualidade superior. No Brasil, é permitido que uma cerveja tenha até 45% de cereais não maltados em sua composição que tem, como objetivo, produzir uma bebida mais barata, com sabor de cerveja e em grande quantidade [4].

Milho, arroz e trigo são os cereais mais utilizados como adjuntos cervejeiros por serem ricos em amido, são chamados adjuntos amiláceos [49] Dados da TBCA para os cereais (*in natura*) cevada, milho, trigo e arroz mostram a concentração de minerais em mg por 100 g destes cereais e pode se observar menor concentração de metais presentes no milho e arroz em comparação com a cevada [50].

A maioria das cervejas lager analisadas neste trabalho também possuíam em seu rótulo a classificação “puro malte” isso pode explicar a proximidade entre as médias apresentadas pelos grupos puro malte e lager para boa parte dos metais analisados. Para melhor interpretação dos resultados das determinações, optou-se, então por separar as cervejas analisadas em 5 grupos (Malzbier, sem álcool, pilsen, puro malte e aquelas cervejas que apresentavam classificação “lager” em seu rótulo classificou-se como lager).

Leão et al. [25] determinaram metais em amostras de cerveja artesanais e comerciais por FAAS (Fe, Mg e Zn), FAES (Na) e espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por microondas - MIP OES (Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn) após degaseificação e decomposição em meio ácido em bloco digestor a 160 °C, por 93 min. As faixas de concentrações encontradas (mg L^{-1}) foram as seguintes: 5,68 a 127,0 (Ca); 0,065 a 0,257 (Fe); 245,6 a 636,0 (K); 0,060 a 0,263 (Mn); 27,85 a 91,61 (Na); 0,067 a 0,165 (Ni) e 0,550 a 2,58 (Zn).

Em outro trabalho, Alcázar et al. [10] determinaram Zn, P, B, Mn, Fe, Mg, Al, Sr, Ca, Ba, Na e K em 32 amostras de cervejas (lager, escura e de baixo teor alcoólico) por ICP OES. Os autores aplicaram análise de componentes principais, análise discriminante linear (LDA) e redes neurais artificiais como técnicas de análise exploratória e classificatória. Encontrou-se as seguintes faixas de concentração, em mg L^{-1} , para Ca, Fe, Mn, Zn, Na, K, respectivamente

(19,85 a 107,89); (0,057 a 1065); (0,031 a 0,304); (0,001 a 0,975); (8,36 a 103,03); (200,2 a 832,9).

Nascentes et al. [6] realizaram a determinação de Cu, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica em forno thermospray (TS-FF-AAS). A determinação foi realizada de forma direta após a desgaseificação sem realizar nenhum tipo de digestão da amostra, as faixas de concentrações encontrada para os analitos foram Cu: 38-155 $\mu\text{g L}^{-1}$; Mn: 110-348 $\mu\text{g L}^{-1}$; Zn: 52,7-226 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) havendo concordância com um nível de confiança de 95%.

Gama et al. [11] quantificaram 15 elementos em cerveja por meio da técnica de fluorescência de Raio-X por reflexão total (TXRF). Desenvolveu-se um método de análise direta para determinação dos analitos incluindo K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu e Zn. As faixas de concentração em mg L^{-1} encontradas destes metais foram K (183,8–418,5); Ca (9,82–96,0); Mn (0,06–1,42); Fe (0,07–1,57); Ni (<LD – 1,13) Cu (< LD-0,32); Zn (0,02–1,98) e se mostraram coerentes quando comparados com dados obtidos utilizando-se o método de digestão ácida.

Magarini [51] utilizou FAAS para determinação elementar em cervejas de diversas marcas adquiridas em supermercados da Singapura. A faixa de concentração dos metais foram as seguintes: Ca (72 a 143); Na (35 a 207) em mg L^{-1} ; e os demais metais Cu (31 a 63); Fe (22 a 68); Mn (62 a 190); Zn (0,3 a 29) em $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados mostraram também que o tipo de embalagem (lata de metal ou garrafa de vidro) não contribui de forma significativa para o teor de metais encontrados em cervejas do mesmo tipo mas de embalagens diferentes exceto para o manganês o qual foi encontrado em maior concentração nas amostras armazenadas em garrafas.

Alexa et al. [52] determinou Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni, Se, Sr, Pb e Zn por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em 24 amostras de cervejas originadas de diferentes países. As faixas de concentrações encontradas para os metais Mn, Cu, Fe, Zn e Ni em $\mu\text{g L}^{-1}$ foram Mn (41,0 – 260); Cu (27,3 – 109); Fe (<LD); Zn (23,9 – 101); Ni (<LD – 11,2).

As faixas de concentrações encontradas para os metais de estudo deste trabalho se mostraram compatíveis com aquelas apresentadas nos artigos citados anteriormente, percebendo-se apenas pequenas variações nos valores de limites (inferiores e superiores) com relação às faixas encontradas por alguns autores.

No entanto, vale ressaltar que a concentração de metais em cervejas depende de vários aspectos, podendo variar de acordo com o tipo de cerveja analisada, com o país de fabricação da bebida, processo de fabricação e origem da matéria prima utilizada, logo, fatores como condições do solo, qualidade da água utilizada, entre outros, influenciam na composição elementar da cerveja [7].

3.4. Análise multivariada

3.4.1. Análise de componentes principais

A técnica de PCA foi aplicada na exploração dos dados e na avaliação de formação de grupos de acordo com as similaridades existentes entre as amostras de cerveja com base nas concentrações dos metais determinados. Nesta análise, as duas primeiras componentes principais (PCs) descrevem acumuladamente 53,5% da variância dos dados. Adicionando-se a terceira PC acumula-se 69,3%. A Figura 1 apresenta os gráficos de escores e os gráficos de loadings, combinando-se as três primeiras PCs de duas em duas para evidenciar as tendências de formação de grupos e as variáveis responsáveis pelo agrupamento.

A Tabela 4 mostra os autovalores para as três primeiras PCs na qual os valores marcados em negrito (em módulo $>0,5$) foram considerados significativos para a modelagem dos dados. Nota-se, como era esperado, que as maiores contribuições para a explicação da variância dos dados estão na primeira PC (Cu, Fe, Mn, Na, Ni e Zn), seguido pela segunda (Ca e Na) e terceira (apenas K) PCs.

Tabela 4: Valores de loadings para as três primeiras componentes principais.

Elemento	PC 1	PC 2	PC 3
Ca	0,1903	-0,7329	0,4467
Cu	-0,5142	-0,3388	-0,3669
Fe	-0,7441	-0,4179	0,07293
Zn	-0,6568	-0,3375	0,3872
Mn	-0,7844	-0,02834	-0,1948
Ni	-0,6844	0,2940	0,06472
Na	-0,6415	0,5823	0,05978
K	0,0413	-0,3562	-0,8557

Pode-se observar analisando-se os gráficos de escores e loadings (Figura 1) que não houve formação de grupos definidos, no entanto, observa-se algumas tendências de formação de grupos.

No gráfico PC2 versus PC3 observa-se uma aparente tendência de agrupamento das cervejas tipo lager (simbolizadas por L) no centro do gráfico que possivelmente seria devido às concentrações dos metais Fe, Cu, Ni e Mn, no entanto, os pesos dessas variáveis são baixos no centro do gráfico, logo, não é possível afirmar que as cervejas tipo lager tenderam a se agrupar o que pode também foi confirmado posteriormente ao realizar a análise de Kohonen.

Quando se plota PC1 versus PC2, nota-se a tendência de agrupamento das amostras de cerveja sem álcool (simbolizado por SA no gráfico), no quadrante superior direito e parte do quadrante superior esquerdo, devido às baixas concentrações encontradas para todos os metais nas cervejas tipo sem álcool. As amostras de cerveja Malzbier (simbolizado por MZ) também mostram tendência ao agrupamento no quadrante superior esquerdo do gráfico de escores PC2 versus PC3. Este comportamento é explicado pelas concentrações de Ca, Zn e Fe, o que está de acordo com o que foi discutido anteriormente, uma vez que as amostras de cerveja Malzbier apresentaram maior média de concentrações para tais metais.

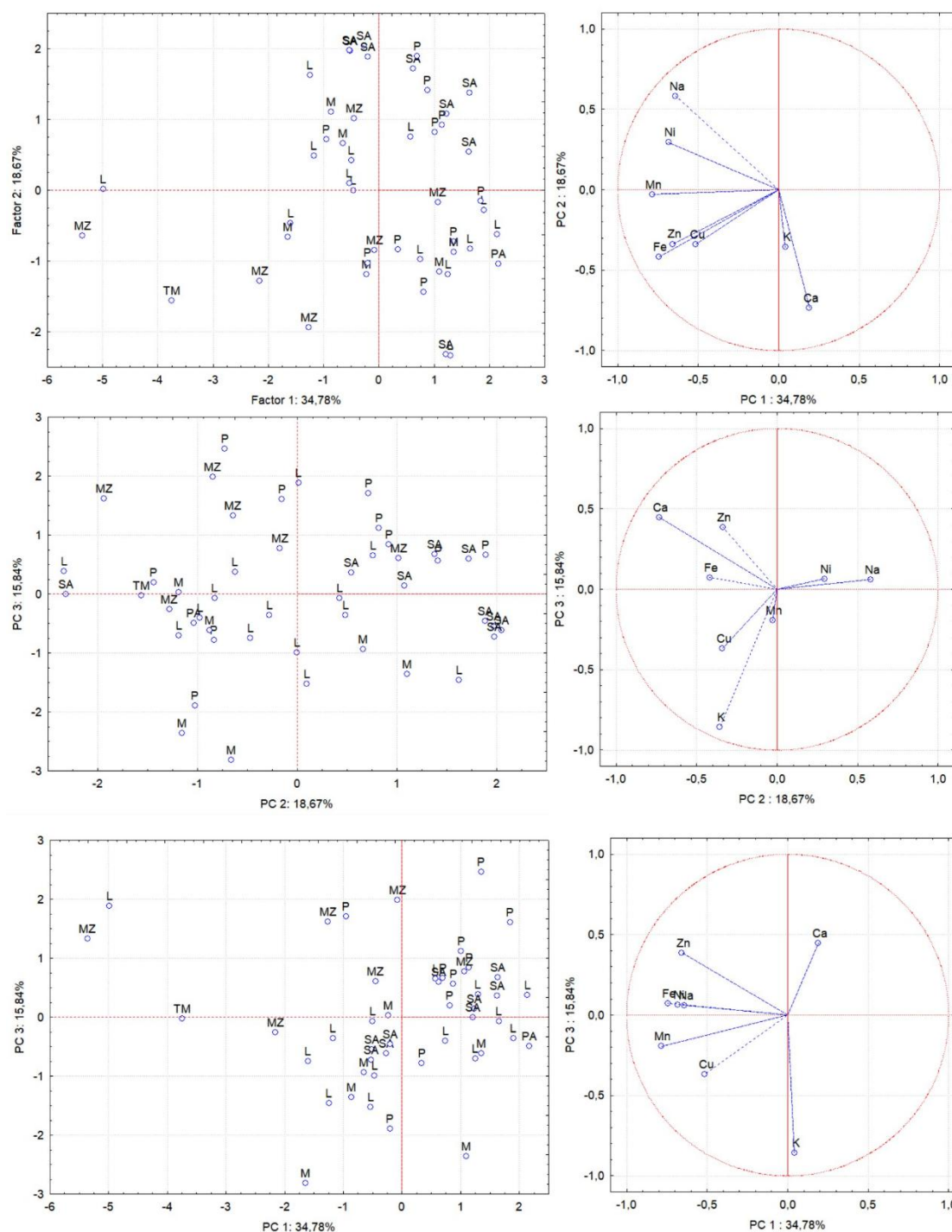


Figura 1: Gráficos de escores e seus respectivos gráficos de loadings para as combinações de componentes principais: (a) PC1 x PC2, (b) PC2 x PC3 e (c) PC1 x PC3. Legenda: MZ: Malzbier; L: Lager; SA: Sem álcool; P: Pilsen; M: Puro Malte.

Na análise por PCA conclui-se que, embora não houve formação de grupos bem definidos e separados de um mesmo tipo de amostras, sem a “contaminação” por amostras de outros tipos, notou-se tendências ao agrupamento de determinados grupos de cervejas, tais como a cervejas tipo

malzbier e sem álcool. Os outros dois grupos não apresentaram essa tendência de agrupamento e suas amostras apresentaram-se muito dispersas no gráfico. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que as amostras tipo pilsen e puro malte analisadas sempre apresentavam alguma característica a mais como por exemplo “puro malte tropical”, “puro malte tipo IPA” ou “pilsen sub-zero” entre outros.

Existe uma variedade muito grande de tipos de cervejas atualmente, deve se considerar também que muitas cervejas pilsen são também puro malte, e existem cervejas puro malte que também são sem álcool ou puro malte aromatizadas, aquelas acrescidas de frutos ou casca de frutas e especiarias, como algumas que foram analisadas nesta pesquisa.

3.4.2. Mapas auto-organizáveis de Kohonen

Na intenção de avaliar e comparar a capacidade de reconhecimento de padrões, aplicou-se a técnica de mapas auto-organizáveis de Kohonen. A validação do mapa de Kohonen obtido a partir dos dados de amostras de cervejas foi realizada estimando os parâmetros empíricos EQ e ET. O EQ representa a média das distâncias entre cada vetor de dados e o vetor de peso correspondente do neurônio vencedor e, apesar de não existir um valor padrão, considera-se quanto menor erro, melhor o neurônio vencedor definirá os vetores de entrada. Enquanto o ET quantifica a capacidade do mapa de representar a topologia dos dados de entrada, sendo calculado verificando-se para todas as entradas, qual neurônio é o melhor e qual é o segundo melhor [53]. O ET também não possui um valor padrão, mas é melhor representado quando os valores tendem a zero. Neste estudo, os valores de erro de quantização e erro topográfico foram respectivamente a 0,2944 e 0,0013 e estão de acordo com outros trabalhos na literatura [54, 55].

A Figura 2 mostra o mapa neural bidimensional para as 47 amostras de cerveja agrupadas de acordo com suas semelhanças em relação ao teor mineral. Cada hexágono representa um neurônio no mapa e cada amostra é representada por um neurônio. A Figura 3 mostra a divisão das amostras em cinco grupos junto com o dendograma obtido por análise hierárquica por agrupamento (HCA). No entanto, nenhum desses grupos está bem definido em

relação a algum tipo de amostra. As amostras de cerveja sem álcool se distribuíram entre dois grupos (o roxo e o azul). As amostras de cerveja lager se distribuíram nos grupos identificados pelas cores verde, azul e rosa. As amostras de cerveja malte distribuíram-se entre os grupos azul, rosa e verde.



Figura 2: Matriz de distância (U-matriz) para os dados gerados pela análise elementar das amostras de cerveja.

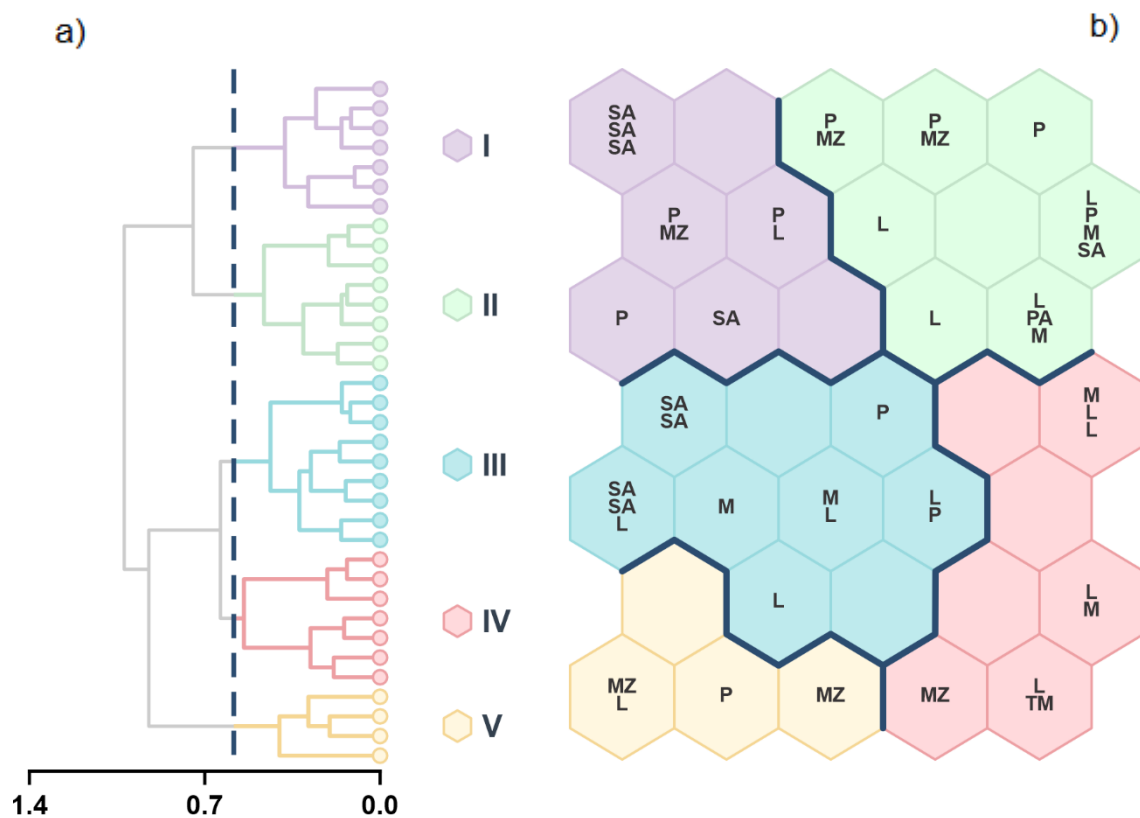


Figura 3: (a) dendrograma obtido de análise hierárquica por agrupamento e (b) componentes do mapa neural legendados mostrando a formação de cinco grupos com suas respectivas amostras e neurônios ativos.

A Figura 4 apresenta os mapas dos componentes para os dados obtidos da análise das amostras de cerveja. Nestes mapas é possível perceber como os teores dos metais influenciam a separação dos grupos. O grupo destacado com a cor roxa é caracterizado por possuir baixa concentração de todos os metais determinados. O grupo verde apresenta as maiores concentrações de Ca. O grupo azul possui maiores concentrações de Cu e Ni. O grupo amarelo apresenta as maiores concentrações de Fe, Na, Ni e Zn. E finalmente, o grupo rosa, maiores concentrações de K, Mn e Fe.

Estas variáveis influenciam a localização das amostras dentro dos grupos. Pequenas distâncias podem ser associadas com ativação neural similar, enquanto maiores distância entre eles servem para delimitação dos grupos. Metais que formam o mesmo grupo mostram pequenas distâncias entre si e configuram uniformidade de cor, ou seja, os altos valores em vermelho escuro e baixos valores em azul.

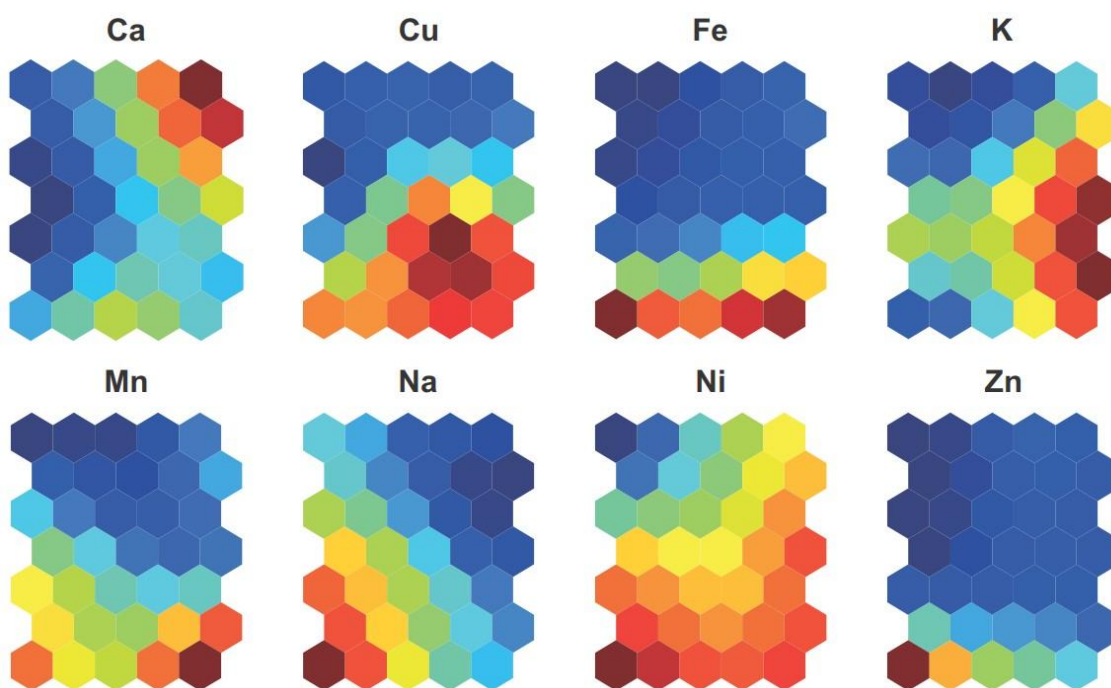


Figura 4: Mapas dos componentes. Os mapas mostram as contribuições de cada metal na modelagem dos dados. As cores azuladas representam baixas concentrações relativas dos metais e as cores mais avermelhadas, maiores concentrações.

No intuito de avaliar a formação de subgrupos dentro dos cinco grupos formados aplicou-se uma nova abordagem que consiste em aplicar um dendrograma sobre o mapa neural obtido. Os resultados são apresentados no gráfico da Figura 5. Nota-se que os grupos roxo, verde e rosa se subdividiram em dois grupos. O grupo azul se subdividiu em três subgrupos e o grupo amarelo continuou apenas com um grupo. Outra forma de avaliar seria juntar grupos de acordo com a similaridade. Assim, poder-se-ia juntar os grupos roxo e verde e os grupos azul e amarelo, deixando o mapa dividido em três grupos.

No entanto, nota-se que estas novas divisões não resultaram em melhorias no agrupamento das amostras de acordo com seu tipo ou com sua marca. Provavelmente isto aconteceu devido a variabilidade das concentrações dos metais ser muito grande e depender principalmente da matéria prima utilizada (um fator inconstante) e não depender tanto do tipo da cerveja fabricada. A aplicação de KSOMs vem se mostrando uma excelente ferramenta de exploração de dados em trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa, apresentando resultados melhores que aqueles obtidos por PCA ou HCA. No entanto, devido à grande variabilidade dos dados de concentração dos metais e pouca relação com as classes das amostras (tipos de cervejas), esta ferramenta não conseguiu atender nossos objetivos. Mas este fato está mais relacionado com a origem dos dados do que com a eficiência da ferramenta quimiométrica utilizada.

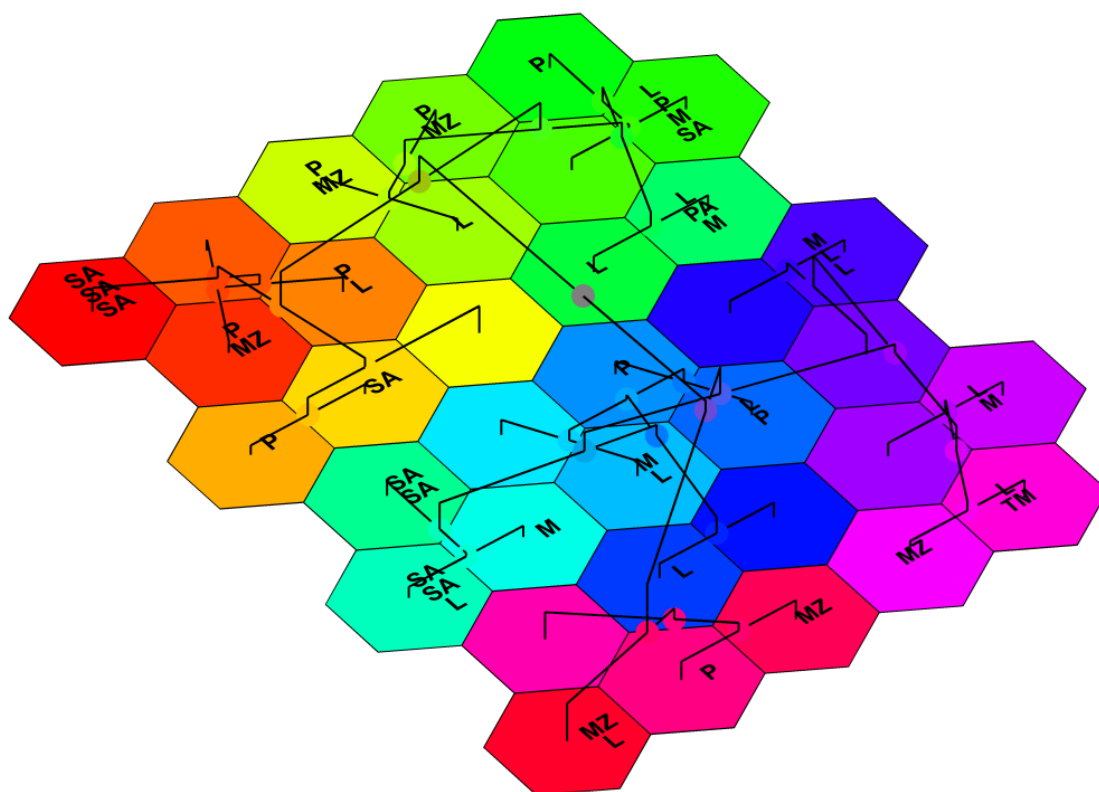


Figura 5: Dendrograma aplicado sobre o mapa neural de Kohonen mostrando a formação de subgrupos sobre os cinco grupos formados.

3.5. Conclusões

A aplicação de técnicas de análise multivariada de dados na avaliação das concentrações de metais em amostras de cerveja de diferentes tipos pode revelar informações latentes que não seriam percebidas por simples inspeção visual. Embora as variabilidades das concentrações dos metais estudados nas amostras analisadas não permitiram a formação de grupos definidos e não contaminados por outras amostras, de acordo com a marca ou de acordo com o tipo de cerveja, a PCA revelou que pode haver reconhecimento de tendência de formação de três grupos. As amostras que tenderam ao agrupamento foram das cervejas lager, Malzbier e sem álcool. Por outro lado, a aplicação de KSOMs, embora reconhecidamente tenha melhor capacidade de exploração de dados e reconhecimento de padrões, neste caso restrito, não atendeu aos objetivos de reconhecer os grupos de amostras tanto de acordo com a marca quanto ao tipo de cerveja com base em seu teor de metais.

4. CAPÍTULO 2

Aplicação de Planejamento Doehlert no desenvolvimento de método analítico com base em diluição em meio ácido e energia de ultrassom para determinação de metais em cervejas

4.1. Introdução

A cerveja é uma bebida produzida pela fermentação de malte de cevada, ou de outros cereais (tais como, arroz, milho, trigo, etc.) e aromatizada com lúpulo. Ela apresenta um teor energético de 400 Kcal L^{-1} representando cerca de 15% das necessidades de uma pessoa adulta por dia. Os sais minerais de Ca, P, K, Zn e Mg presentes em sua composição ($0,4 \text{ g L}^{-1}$) representam 10% das necessidades de ingestão diárias do ser humano. A bebida também é rica em polifenóis, fibras e vitaminas, principalmente as do complexo B [25,56]. Em 2022 o consumo de cerveja em todo mundo foi cerca de 192,1 milhões de quilolitros, mostrando a força dessa indústria na economia de diversas nações [57].

Os teores de metais em cervejas podem ser reflexo das matérias primas utilizadas em sua produção, do processo de fabricação e do armazenamento. O solo onde a plantação dos vegetais utilizados na sua produção está estabelecida, os fertilizantes, os agroquímicos e corretivos agrícolas contribuem para que ocorra uma grande variação deste parâmetro. Sabe-se também que o recipiente de armazenamento pode contaminar este produto com metais. Além disso, a presença de metais de transição pode catalisar a degradação de substâncias e diminuir o seu tempo de prateleira. Desta forma, a determinação de metais em cervejas é um tópico de grande relevância para esta indústria e para as ciências da saúde, visto que o conhecimento de seus teores é importante para se estabelecer sua importância nutricional e promover a conservação da cerveja por um maior período de tempo.

Nos últimos anos, os analistas vêm procurando desenvolver métodos alternativos à decomposição da amostra para a determinação da composição elementar das mais diversas matrizes. Estes métodos possuem a vantagem de serem mais simples, rápidos e apresentarem características analíticas compatíveis com as necessidades da análise realizada. Um desses métodos se constitui na diluição de amostras líquidas em meio ácido. Amostras de natureza aquosa tais como sucos, bebidas alcoólicas, refrigerantes, podem ser diluídas em diversos ácidos minerais e orgânicos, tais como ácido nítrico, clorídrico, fórmico e acético. Estes ácidos possuem a função de ajudar a degradar a amostra no atomizador liberando o analito para determinação por alguma técnica de espectrometria atômica [58].

A técnica de diluição em meio ácido tem sido empregada no preparo de amostras de bebidas com base em extrato de guaraná visando quantificar Cu, Fe, Mn, Zn, K, Ca, S, P e Mg por ICP OES [59], determinar metais traço em amostras de águas naturais por ICP OES [60], determinação de Mn, Fe, Zn e Cu em amostras de água de coco por ICP OES [61], entre outros.

O termo “matriz de planejamento experimental” se refere a um conjunto de combinações entre os níveis das variáveis estudadas que definem os experimentos que devem ser executados. O objetivo é realizar uma modelagem matemática, ajustando funções para descrever o comportamento dos dados e realizar previsões que permitam encontrar as condições ótimas para aplicação daquele procedimento. A matriz Doehlert foi desenvolvida por David H. Doehlert e tem oferecido muitas vantagens em relação às matrizes tradicionais, tais como a alta eficiência da modelagem utilizando menos pontos experimentais e possibilitar a atribuição de número de níveis diferentes às variáveis estudadas [62,63,64,65].

Na área de alimentos, matriz Doehlert tem sido aplicada no desenvolvimento de métodos analíticos visando a otimização: da microextração líquido-líquido para determinação de Cu e Mn em amostras de água de coco [66], de um método com base em amostragem por suspensão para determinação de Fe, Mn e Zn em amostras de spirulina [67], da extração em fase sólida de Cu livre e Cu total em amostras de alimentos usando bambu como adsorvente [68], da microextração em fase sólida na modalidade headspace de bifenilas policloradas em leite humano [69], da separação eletroforética de compostos fenólicos em óleos de oliva extravirgem [70], do processo de extração de acetato e formiato em óleos vegetais visando a determinação por cromatografia iônica [71], da extração assistida por ultrassom de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, K, P, Mg e Na em amostras de leite de coco por ICP OES [72], entre outros.

Neste trabalho, planejamento Doehlert e função de desejabilidade foram utilizadas para otimização de uma metodologia com base na diluição de amostras de cerveja em meio ácido auxiliada por energia de ultrassom para determinação de Ca, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn por espectrometria de absorção atômica e Na e K por espectrometria de emissão atômica com chama.

4.2. Experimental

4.2.1. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica com chama da Perkin Elmer (Modelo AAnalyst 200, Norwalk, CT, Estados Unidos) foi usado para a determinação dos metais nas amostras de cerveja. O espectrômetro é suprido com uma lâmpada de deutério para correção da absorção de fundo. Lâmpadas de cátodo oco foram usadas como fonte de radiação nas medidas de absorção para os elementos Ca, Cu, Fe, Mn, e Zn usando-se os comprimentos de onda (nm) 422,7; 324,7; 248,3; 279,5; 213,9, respectivamente. Para os elementos Na e K, o mesmo espectrômetro foi usado no modo emissão usando-se os comprimentos de onda 589.0 e 766.5 nm, respectivamente. A chama foi mantida pela mistura de ar atmosférico (fornecido por um compressor (13,5 L min⁻¹) e acetileno (2,0 L min⁻¹). A razão (taxa/vazão) de fluxo de aspiração da amostra no nebulizador foi ajustada para 5,0 mL min⁻¹.

Um bloco digestor da Tecnal (Modelo TE 0851, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com 40 cavidades provido com tubos de vidro e dedo frio foi utilizado para digerir algumas amostras visando sua comparação com as amostras tratadas pelo método desenvolvido. Um banho de ultrassom da Cristofoli (Campo Mourão, Paraná, Brasil.) foi utilizado para o preparo das amostras após diluição em meio ácido.

4.2.2. Reagentes e soluções

Soluções estoques concentradas dos ácidos nítrico (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil), clorídrico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), fórmico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) utilizadas neste trabalho foram de grau analítico. Peróxido de hidrogênio 35 % (vv⁻¹) (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil) foi utilizado juntamente com ácido nítrico na decomposição das amostras. Soluções padrão estoques 1000 mg L⁻¹ (mv⁻¹) de Ca, Cu, Mn, Zn, Fe, Na e K (Specsol, Jacareí, São Paulo) conservadas em HCl 1% (vv⁻¹) foram usadas na construção de curvas analíticas e para realizar testes de adição/recuperação (testes spike). Solução de surfactante TritonTM X-114 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) 5% (mv⁻¹) foi utilizada para o preparo de soluções mais diluídas. Para descontaminação preenchia-se as vidrarias com

uma solução de ácido nítrico 5% (vv⁻¹), após 12 horas de contato com a solução de ácido, as vidrarias foram enxaguadas com água deionizada e secas em ambiente livre de poeira. Água deionizada foi obtida por meio de um sistema Permution (Labnorte, Salvador Bahia).

4.2.3. Aquisição das amostras

Amostras de cerveja dos tipos lager, pilsen, puro malte, sem álcool, cerveja aromatizada (armazenadas em embalagem de latinhas de 350 mL) e a cerveja tipo Malzbier (armazenada em embalagem de garrafa de vidro) foram adquiridas em supermercados da cidade de Jequié (Bahia, Brasil). As amostras foram levadas ao laboratório e armazenadas em temperatura ambiente em armários protegidos da luz solar e abertas somente no momento do tratamento. Após o tratamento as amostras foram conservadas sob refrigeração.

4.2.4. Otimização do método

Um mix composto pelos seis tipos de cervejas (lager, puro malte, pilsen, sem álcool, aromatizada e malzbier) em mesma proporção, previamente degaseificadas foi utilizado na etapa de otimização. Para a otimização do método, primeiramente realizou-se o estudo do tipo de ácido (nítrico, clorídrico, acético e fórmico) a ser utilizado na diluição. Após a escolha do ácido, para otimizar as variáveis (concentração do ácido, tempo de sonicação e concentração de surfactante) que também podem estar envolvidas com o desempenho do método de diluição em meio ácido auxiliado por energia de ultrassom, usou-se um planejamento experimental Doehlert. As variáveis concentração de ácido e tempo de sonicação foram estudadas em 5 níveis e a variável concentração do surfactante foi estudada em 3 níveis. Função de desejabilidade foi aplicada com o objetivo de otimizar simultaneamente as respostas obtidas pela aplicação do planejamento. O software Statistica 7.0 foi utilizado para tratamento dos dados obtidos na aplicação da matriz experimental, modelagem matemática e geração de gráficos. A Tabela 5 apresenta a matriz experimental e os resultados obtidos.

4.2.5. Decomposição ácida em bloco digestor

Para realizar a decomposição por via úmida, 10,0 mL de cada amostra de cerveja foi transferida para um tubo digestor de vidro. Posteriormente, 5,0 mL de ácido nítrico concentrado e 2,0 mL de peróxido de hidrogênio foram acrescentados a cada tubo, os quais foram levados ao bloco digestor para aquecimento e digestão simultânea. Acoplou-se o dedo frio e a decomposição foi ser realizada a uma temperatura de 120 °C. Após algum tempo, as amostras liberaram um vapor de cor castanha até que estas adquiriram uma coloração clara. Depois disto, as amostras foram aquecidas até quase secura para liberarem o excesso de ácido e então finalizou-se o aquecimento. Subsequentemente, aguardou-se as amostras atingirem a temperatura ambiente para serem quantitativamente transferidas para um tubo tipo Falcon (lavou-se as paredes do frasco de decomposição três vezes e incorporou-se a água de lavagem à solução final), em seguida completou-se o volume para 25 mL. Os digeridos obtidos foram armazenados em um refrigerador até o momento da análise.

4.2.6. Método de preparo da amostra obtido após processo de otimização

Uma alíquota de 5,0 mL da amostra de cerveja deve ser transferida para um tubo de centrífuga de vidro de fundo cônico. Em seguida, adiciona-se 1,4 mL de ácido nítrico 2,2 mol L⁻¹, cobre-se o tubo com filme plástico e leva-se esta mistura para ser submetido ao banho de ultrassom por 15 min. Em seguida dilui-se esta mistura para 10,0 mL com água deionizada, transfere-se o conteúdo para um tubo Falcon com tampa e mantém-se sob refrigeração até o momento da análise.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Estudo do tipo de ácido

A escolha do tipo de ácido para realizar a diluição das amostras foi realizada através do tratamento do mix de amostras com os quatro diferentes tipos de ácido utilizando banho ultrassônico por um tempo de 20 minutos. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 6.

Nota-se que para a maior parte dos metais estudados, o ácido nítrico apresentou respostas médias semelhantes ou maiores que as dos outros ácidos. Provavelmente isto aconteceu devido ao poder oxidante que este ácido possui frente aos ácidos orgânicos fracos e ao HCl. Este comportamento somente não foi observado para o Ni e para o Na. Para estes dois metais, o uso de ácido acético gerou respostas maiores em comparação com o uso do ácido nítrico, no entanto, resolveu-se retirar o níquel do estudo pois ele apresentava respostas muito baixas (muito próximas do branco) além das respostas flutuarem em grande extensão.

Para o Na os maiores sinais foram observados quando se utilizou os ácidos acético e fórmico, no entanto, o desvio padrão associado às medidas do ácido fórmico foi alto optando-se por não utilizar este ácido nos experimentos. Além disso, a magnitude das respostas para este metal foram suficientemente altas e satisfatórias para atender aos objetivos de aplicação do método. Assim, diante destes experimentos, resolveu-se escolher o HNO_3 para realizar a diluição das cervejas visando a determinação de metais por FAAS e FAES, pois a grande maioria dos metais geraram respostas maiores na presença deste ácido.

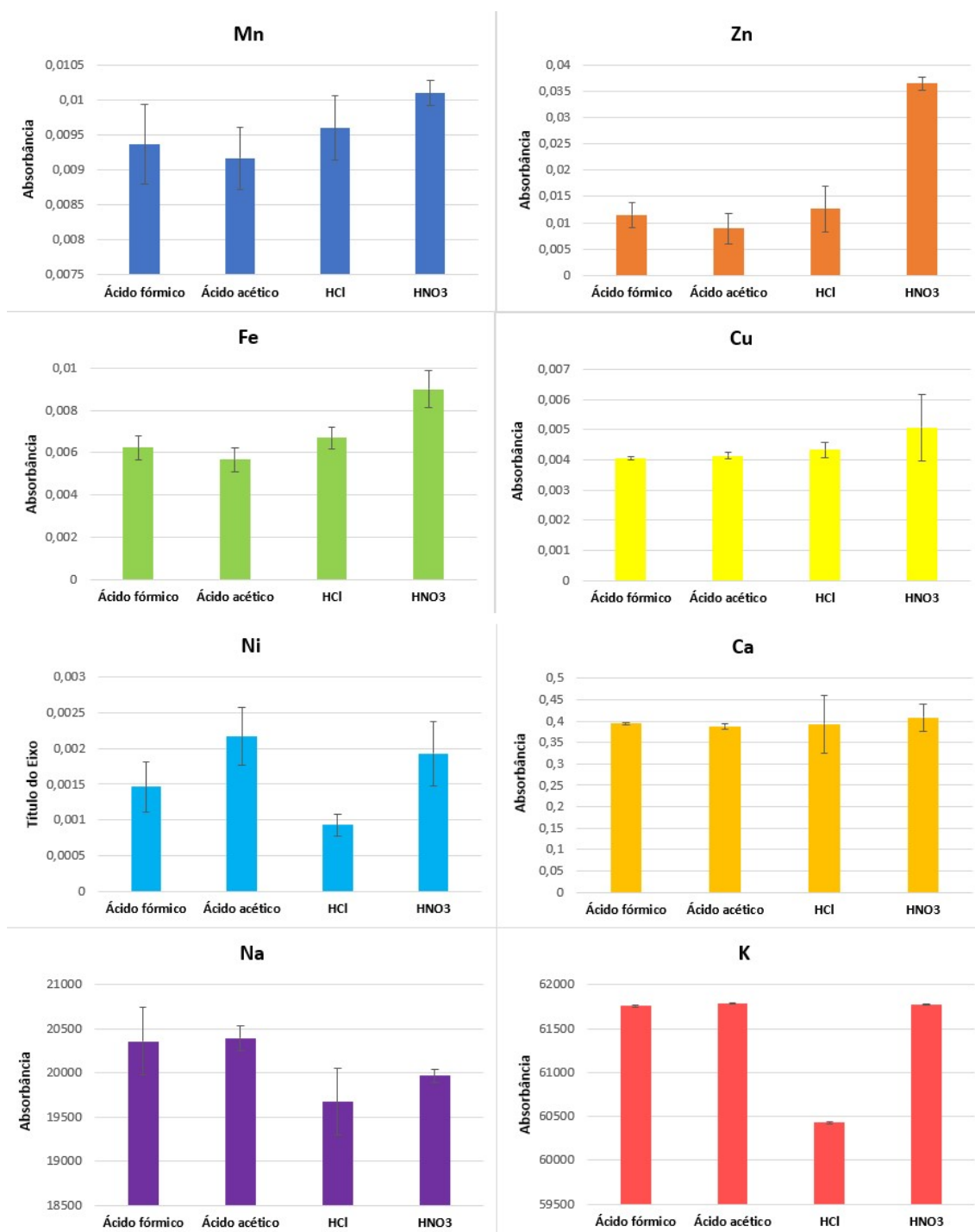


Figura 6: Estudo da influência do tipo de ácido no sinal analítico (absorbância) no método de diluição da cerveja em meio ácido. Condições experimentais: concentração dos ácidos 2,0 mol L⁻¹, tempo de sonicação 20 min. N=2

4.3.2. Otimização do procedimento por matriz Doehlert

As matrizes de planejamento Doehlert vem sendo muito aplicadas na otimização de métodos analíticos devido às suas características e vantagens, tais como, demandar menor quantidade de experimentos, alta eficiência de modelagem e flexibilidade na escolha do número de níveis para as variáveis. Esta matriz foi utilizada neste estudo para encontrar as melhores condições para a diluição das amostras de cerveja em meio ácido.

As variáveis concentração de ácido nítrico (CA), tempo de sonicação (TS) e concentração do surfactante (CS) foram respectivamente estudadas no intervalo 0,2 a 1,7 mol L⁻¹, 10 a 30 min e 0 a 2% vv⁻¹. A Tabela 5 apresenta esta matriz experimental juntamente com as respostas na forma de sinal analítico (absorbância ou emissão). Cada um dos 13 experimentos que constituem a matriz foi realizado em duplicata para possibilitar a estimativa do erro experimental.

Função de desejabilidade, usando um algoritmo com o objetivo de maximizar a resposta, foi utilizada para a modelagem simultânea das sete respostas obtidas (os sinais dos analitos). A desejabilidade individual, com objetivo de maximização foi encontrada pela expressão simplificada:

$$d_i = (x_i - x_L)/(x_m - x_L) \quad \text{Equação 1}$$

Onde d_i é a desejabilidade individual, x_i o valor do sinal analítico para um dado nível experimental, x_L é o menor sinal analítico observado para um dado metal e x_m é o maior sinal analítico.

A desejabilidade global (DG) foi obtida pelo cálculo da média geométrica das desejabilidades individuais segundo a expressão abaixo:

$$DG = \sqrt[7]{d_{Ca}d_{Cu}d_{Fe}d_{Mn}d_{Zn}d_{Na}d_K}$$

A modelagem por mínimos quadrados foi aplicada aos valores da desejabilidade global para ajustar funções que melhor descreva o comportamento dos dados. A função quadrática foi a que melhor apresentou capacidade de predição e localização das condições ótimas.

Tabela 5: Matriz de planejamento Doehlert e respostas para otimização das variáveis envolvidas no desempenho da diluição de amostras de cerveja em meio ácido visando a determinação de metais por FAAS/FAES.

Exp.	Variáveis			Sinal Analítico						
	CA	TS	CS	Ca	Cu	Mn	Zn	Fe	Na	K
	(mol/L)	(min)	(%v/v)							
1	1,2	30	1	0,0759	0,0022	0,0026	0,0136	0,0057	2711	37075
				0,0827	0,0015	0,0028	0,0156	0,0055	2734	35395
2	0,7	25	0	0,2225	0,0028	0,0028	0,0088	0,0029	5859	34723
				0,2188	0,0029	0,0034	0,0087	0,0022	5720	34936
3	0,7	25	2	0,1789	0,0016	0,0046	0	0,0735	3294	34937
				0,1197	0,0026	0,0027	0	0	3278	34519
4	1,7	25	0	0,2362	0,0024	0,0035	0,0062	0,1057	5969	34753
				0,2368	0,0014	0,0046	0,0088	0,1117	5973	35477
5	1,7	25	2	0,1289	0,0024	0,0042	0,0237	0,022	3359	33177
				0,1204	0,0035	0,0029	0,013	0,0068	3358	32815
6	0,2	20	1	0,0944	0,0028	0,0034	0	0	3406	36068
				0,1067	0,0044	0,0035	0,0032	0,0019	3395	35441
7	1,2	20	1	0,1086	0,002	0,0038	0	0	3238	33709
				0,1024	0,0033	0,005	0	0,0178	3279	33458
8	2,2	20	1	0,1017	0,0033	0,0038	0,0135	0,0109	2992	32913
				0,0899	0,0032	0,004	0,0159	0,01	3199	31752
9	0,7	15	0	0,2028	0,0031	0,0039	0	0,0063	5786	35183
				0,1713	0,0029	0,0041	0	0,012	5915	35544
10	0,7	15	2	0,1089	0,0037	0,0034	0	0	3229	33033
				0,1115	0,0027	0,0035	0	0,0008	3318	33873
11	1,7	15	0	0,1889	0,003	0,0049	0,0254	0,0299	5650	33198
				0,1765	0,0035	0,004	0,0194	0,0245	5662	32945
12	1,7	15	2	0,0491	0,0035	0,0032	0,0072	0,0083	2963	31212
				0,0734	0,0043	0,0031	0,0095	0,0057	2904	31311
13	1,2	10	1	0,0533	0,0041	0,0051	0,0044	0,0049	3237	33972
				0,0376	0,004	0,0049	0,0081	0,0081	3170	34067

CA: concentração do HNO₃; TS: tempo de sonicação e CS: concentração do surfactante

A Figura 7 apresenta os perfis de desejabilidade individuais (para cada metal) e o perfil de desejabilidade global (última linha) obtida pelo ajuste de uma função matemática quadrática. O valor máximo de desejabilidade global

alcançado é igual a 0,6823. Quanto mais próximo de 1 este valor estiver, isto significa que as condições ótimas para cada resposta (o sinal analítico) se interceptam.

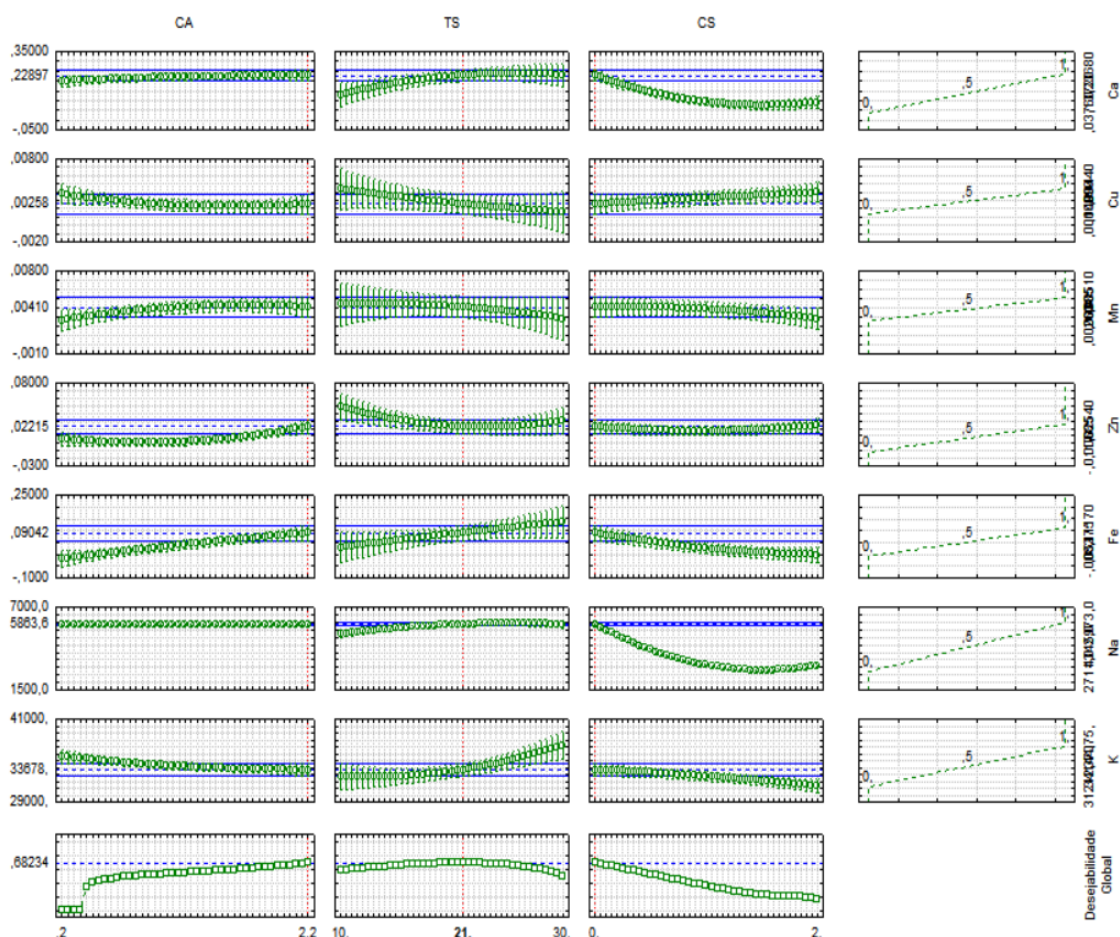


Figura 7: Perfis de desejabilidade obtidas pelo ajuste de uma função quadrática aos dados de absorbância obtidos pela aplicação do planejamento Doehlert.

Observando-se a figura 7 é possível notar que os perfis de desejabilidades individuais foram bem representados pela desejabilidade global uma vez que as perdas observadas para as respostas de alguns metais em cada variável estudada (CA, TS, CS) podem ser consideradas desprezíveis em relação aos demais elementos que apresentaram respostas semelhantes às apresentadas na DG. Por exemplo, para a variável CA, dos sete metais estudados apenas dois (Cu e K) apresentaram maiores d_i em região de concentração menor que a concentração ótima encontrada para o ácido. As d_i mostraram que o tempo de sonicação ótimo variou bastante entre os oito metais resultando em uma DG praticamente contante em uma faixa que vai de 12 a 25 min.

Sendo assim, os valores ótimos indicados pelo programa estatístico foram: concentração final do ácido nítrico de $2,2 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de sonicação de 21 min e não adição de surfactante. Devido a faixa constante no tempo de sonicação (12 a 25 min) apresentada na DG decidiu-se adotar 15 min como valor ótimo para esta variável.

As superfícies de respostas apresentadas na Figura 8 foram também obtidas pelo ajuste de uma função quadrática à desejabilidade global. Nelas é possível visualizar o comportamento da resposta em função da variação dos níveis das variáveis duas a duas. Estas superfícies corroboram os valores obtidos nos perfis de desejabilidade.

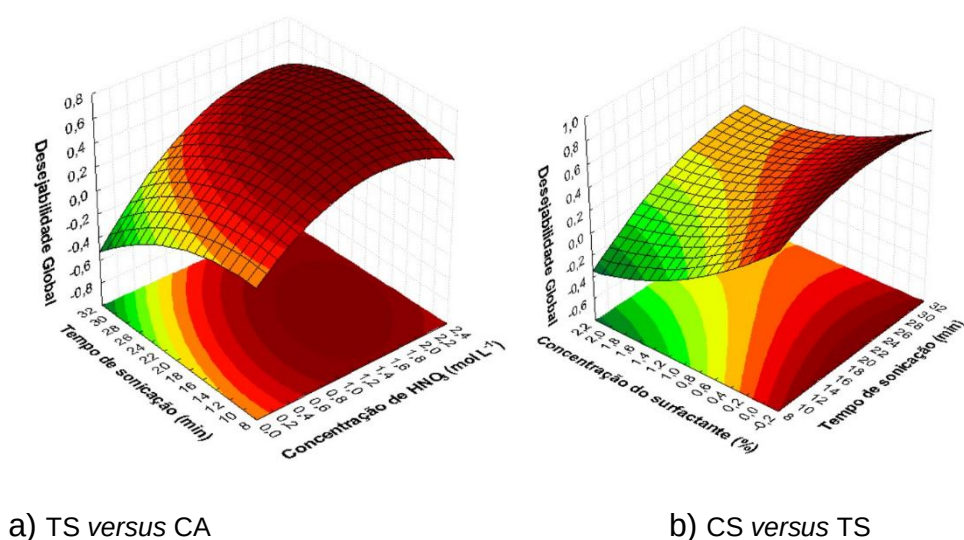


Figura 8: Duas superfícies de respostas parciais obtidas pelo ajuste de uma função quadrática aos dados obtidos pela aplicação do planejamento Doehlert. (a) TS versus CA e (b) CS versus TS.

4.3.3. Avaliação de efeitos de matriz

Os estudos de efeito de matriz são realizados com o objetivo de verificar possíveis interferências provocadas por substâncias que fazem parte da matriz da amostra causando diminuição ou aumento do sinal instrumental. Esta avaliação é importante para evitar erros na determinação das concentrações dos metais devido à falta de correspondência com o meio no qual a curva analítica foi obtida.

Para realizar este estudo, foram avaliados os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas nos seguintes meios: (i) solução aquosa acidificado com HNO_3 0,1% vv^{-1} e (ii) adição dos padrões metálicos à amostra diluída em HNO_3 2,2 mol L^{-1} conforme as condições otimizadas. Intervalos de confiança para as inclinações das curvas analíticas com nível de confiança de 95% foram obtidos com a intenção de verificar suas intersecções e são apresentadas na Tabela 6. Desta forma, considera-se que não há efeito de matriz quando os intervalos de confiança das inclinações apresentam algum subintervalo de intersecção.

A partir deste critério, verificou-se que a determinação dos metais Ca, Cu, Fe, Mn e Zn foram afetadas por efeitos de matriz. As inclinações das curvas analíticas para estes metais apresentaram magnitude menor quando estas foram construídas com adição de analito às amostras. Ca, Mn e Zn são os metais que mais sofreram queda em seus sinais (atingindo quedas de 59, 45 e 32% respectivamente) e, portanto, maior efeito de matriz. Por outro lado, os sinais para K e Na, determinados por emissão, não sofreram interferências da matriz.

Os metais que apresentaram efeito de matriz foram determinados usando-se as curvas analíticas obtidas por adição padrão. No entanto, para eliminar a contribuição do metal proveniente da amostra, subtraiu-se os sinais de absorbância dos metais (encontrados em cada solução padrão) dos sinais encontrados na amostra. Para K e Na, como não houve efeito de matriz, utilizou-se a curva analítica obtida com os padrões aquosos.

Como a cerveja apresenta cerca de 5% vv^{-1} de etanol, há também a possibilidade de simular a matriz construindo-se uma curva analítica acrescentando esse teor de álcool às soluções padrão. O álcool pode alterar a taxa de nebulização da amostra em comparação com as soluções aquosas acidificadas usadas na construção das curvas analíticas. Porém, esta abordagem não foi estudada neste trabalho.

Tabela 6: Parâmetros das curvas analíticas para Ca, Cu, Fe, Mn e Zn obtidas em meio aquoso acidificado e por adição padrão no mix da amostra dissolvida em meio ácido.

	Curva analítica	IC* (NC=95%)	R ²
Ca			
Em meio aquoso acidificado	$y = 0,0520x + 0,0059$	0,0474 – 0,0567	0,9940
Adição padrão**	$y = 0,0216x + 0,620$	0,0186 – 0,0247	0,9886
Cu			
Em meio aquoso acidificado	$y = 0,0779x + 0,004$	0,0762 – 0,0795	0,9998
Adição padrão**	$y = 0,0667x + 0,0048$	0,0638 – 0,0695	0,9986
Mn			
Em meio aquoso acidificado	$y = 0,0941x + 0,006$	0,0877 – 0,101	0,9986
Adição padrão**	$y = 0,0641x + 0,0142$	0,0588 – 0,0694	0,9965
Zn			
Em meio aquoso acidificado	$y = 0,2804x + 0,0147$	0,2543 – 0,3064	0,9975
Adição padrão**	$y = 0,1539x + 0,0293$	0,1069 – 0,1590	0,9940
Fe			
Em meio aquoso acidificado	$y = 0,0312x - 0,0002$	0,0298 – 0,0326	0,9990
Adição padrão**	$y = 0,0271x + 0,0124$	0,0205 – 0,0297	0,9968
Na			
Em meio aquoso acidificado	$y = 82,587x + 4305,3$	57,88 -163,6	0,9822
Adição padrão**	$y = 67,227x + 7727,5$	56,84 – 99,75	0,9906
K			
Em meio aquoso acidificado	$y = 452,66x + 19805$	389,4 – 515,9	0,9942
Adição padrão**	$y = 428,91x + 25441$	293,3 – 564,5	0,9507

*IC: Intervalo de confiança; **na amostra dissolvida em meio ácido

4.3.4. Avaliação do desempenho do método de diluição em meio ácido e aplicação nas amostras de cervejas

As condições otimizadas foram utilizadas na realização de experimentos para o estabelecimento das características analíticas do método. Para se calcular os limites de detecção de cada metal, utilizou-se o desvio padrão amostral (s) de dez medidas do branco, multiplicou-se por 3 e dividiu-se pelo respectivo coeficiente angular da curva analítica. O limite de quantificação foi calculado de forma semelhante multiplicando-se por 10 ao invés de 3.

A precisão (% do desvio padrão relativo, RSD) foi obtida em termos de repetibilidade para dez medições de uma solução 0,5 mg L⁻¹. A sensibilidade de um método refere-se à sua habilidade em discriminar pequenas diferenças na

concentração de um analito. A sensibilidade foi avaliada pela inclinação das curvas analíticas (coeficiente angular).

Os valores encontrados para os LDs, LQs, %RSD e sensibilidade obtidos para o método encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Alguns parâmetros analíticos de mérito obtidos para o método desenvolvido.

Analito	Ca	Cu	Fe	K	Mn	Na	Zn
LD (mg L ⁻¹)	0,075;	0,022	0,036	0,11	0,12	0,038	0,042
LQ (mg L ⁻¹)	0,25	0,073	0,12	0,36	0,38	0,13	0,14
%RSD	4,2	2,8	2,7	4,1	2,2	3,8	4,0
Sensibilidade (abs L mg ⁻¹)	0,0216	0,0667	0,0271	428,9	0,1518	67,23	0,0622

A linearidade é a capacidade de um método em gerar resultados proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa especificada da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas com soluções padrão nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ menos para os metais Na e K cujas concentrações da curva analítica foram de 20, 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹. A linearidade das curvas foram avaliadas obtendo-se seus coeficientes de determinação (R²) obtendo-se valores entre 0,9940 e 0,9986.

A exatidão refere-se ao grau de concordância entre os resultados de concentração encontrados pela aplicação de um método na análise de uma amostra e um valor de referência aceito como verdadeiro. Neste trabalho, a exatidão foi avaliada de duas formas: (i) aplicando-se ensaios de adição/recuperação (teste spike) dos analitos na amostra e (ii) aplicação de um método padrão (digestão em bloco digestor) na determinação das concentrações dos analitos e comparação dos resultados com aqueles obtidos pela aplicação do método desenvolvido (diluição em meio ácido assistida por ultrassom).

Para os testes spike, as recuperações ficaram entre 90 e 113% (Tabela 8). Na comparação com o método padrão, utilizou-se o teste t pareado para avaliar se os resultados gerados (Tabela 8) são estatisticamente semelhantes. Utilizando-se um nível de confiança de 95%, os valores calculados de t sempre estiveram abaixo do valor crítico, mostrando que o método proposto permite obter resultados com boa exatidão.

Tabela 8: Resultados dos testes de adição/recuperação (teste spike) para dois níveis de concentração (0,5 e 1,5 mg L⁻¹) no mix das amostras de cervejas tratadas pelo método da diluição em meio ácido.

Metal	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg L ⁻¹)*	Rec (%)
Ca	0	32,5 ± 0,8	-
	1,5	34,2 ± 0,5	113
Cu	0	0,076 ± 0,005	-
	0,5	0,524 ± 0,011	90
	1,5	1,53 ± 0,18	97
Fe	0	0,458 ± 0,021	-
	0,5	0,948 ± 0,024	98
	1,5	2,03 ± 0,015	105
Zn	0	0,190 ± 0,021	-
	0,5	0,757 ± 0,017	113
	1,5	1,81 ± 0,012	108
Mn	0	0,221 ± 0,016	-
	0,5	0,703 ± 0,011	96
	1,5	1,79 ± 0,013	105
Na	0	115 ± 8	-
	20,0	136 ± 11	105
	50,0	169 ± 13	108
K	0	59,3 ± 2,1	-
	2,0	61,4 ± 3,0	105

* Média ± desvio padrão

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da determinação dos metais em amostras de cervejas comercializadas em supermercados do município de Jequié/Bahia utilizando a metodologia desenvolvida neste trabalho. As cervejas foram do tipo puro malte, pilsen, sem álcool, malzbier e aromatizada. As concentrações dos metais foram encontradas nas seguintes faixas (mg L⁻¹): Ca (20,4 -37,2); Cu (<LQ); Fe (0,195-0,527); Mn (<LQ a 0,147); Zn (0,101 a 0,188); Na (36,14 a 90,94) e K (248,7 a 460,5).

Tabela 9: Resultados (mg L⁻¹) para determinação de metais (N = 3) em amostras de cervejas e comparação com duas metodologias.

Metal	Amostra	Método da diluição*	Método Digestão Ácida*	Valor t**
Ca	M	23,1 ± 0,4	24,3 ± 0,05	0,706
	AS	32,7 ± 0,5	34,5 ± 0,1	-
	P	32,4 ± 0,3	31,4 ± 0,3	-
	Mz	37,2 ± 0,5	34,6 ± 0,2	-
	Ar	20,4 ± 0,1	17,7 ± 0,2	
Cu	P	<LQ	0,0884 ± 0,008	-
	AS	<LQ	0,154 ± 0,005	-
	P	<LQ	0,0515 ± 0,003	-
	M	<LQ	0,139 ± 0,002	-
	Ar	<LQ	0,155 ± 0,004	-
Fe	P	0,232 ± 0,011	0,228 ± 0,004	2,50
	AS	0,195 ± 0,013	0,161 ± 0,008	-
	P	0,293 ± 0,011	0,281 ± 0,005	-
	M	0,527 ± 0,014	0,525 ± 0,006	-
	Ar	0,213 ± 0,0075	0,187 ± 0,002	
Zn	P	0,152 ± 0,003	0,174 ± 0,005	- 1,35
	AS	0,161 ± 0,002	0,158 ± 0,007	-
	P	0,133 ± 0,007	0,152 ± 0,004	-
	M	0,101 ± 0,003	0,119 ± 0,003	-
	Ar	0,188 ± 0,006	0,177 ± 0,008	
Mn	P	0,0831 ± 0,0064	0,0737 ± 0,0012	0,051
	AS	0,0938 ± 0,0032	0,0817 ± 0,0033	-
	P	<LQ	<LQ	-
	M	0,147 ± 0,024	0,167 ± 0,004	-

Na

P	36,14 ± 0,25	30,14 ± 0,12	0,623
P	90,94 ± 0,89	88,07 ± 0,08	-
M	85,30 ± 0,73	96,41 ± 0,06	-
Ar	75,7 ± 0,62	59,74 ± 0,04	

K

P	362,0 ± 2,8	420,2 ± 0,5	-
AS	460,5 ± 5,2	489,7 ± 0,2	-
P	250,4 ± 0,93	224,2 ± 0,4	-
M	248,7 ± 0,47	220,9 ± 0,3	-

*média ± desvio padrão;

Obs: M: malte; P: Pilsen; AS: Sem álcool; Mz: Malzbier; Ar: Aromatizada.

**Existe diferença significativa entre os dois conjuntos de valores quando o t calculado for maior que 2,77.

4.4. Conclusões do capítulo

O tratamento de amostras de cerveja, com base na diluição em meio ácido, se constituiu em um método rápido, exato, preciso e confiável para determinação de metais em cervejas por FAAS e FAES. O estudo dos tipos de ácido mostrou que o HNO₃ apresentou o melhor desempenho e o uso de planejamento Doehlert possibilitou a otimização simultânea e eficiente das variáveis envolvidas. As características analíticas acessadas foram adequadas e provaram que o método pode ser aplicado para determinação dos metais estudados nas amostras de cerveja de diferentes tipos. A existência de efeito de matriz para a maioria dos metais pode ser contornada utilizando-se o método de calibração que utiliza as soluções padrão construídas com a própria amostra ou por simulação da matriz.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação de técnicas de análise multivariada de dados na avaliação das concentrações de metais em amostras de cerveja de diferentes tipos pode revelar informações latentes que não seriam percebidas por simples inspeção visual. Embora as variabilidades das concentrações dos metais estudados nas amostras analisadas não permitiram a formação de grupos definidos e não contaminados por outras amostras a PCA revelou que pode haver reconhecimento de tendência de formação de dois grupos. Por outro lado, a aplicação de KSOMs, embora reconhecidamente tenha melhor capacidade de exploração de dados e reconhecimento de padrões, neste caso restrito, não atendeu aos objetivos de reconhecer os grupos de amostras devido às características das mesmas.

O tratamento de amostras de cerveja, com base na diluição em meio ácido, se constituiu em um método rápido, exato, preciso e confiável para determinação de metais em cervejas por FAAS. O uso de planejamento Doehlert possibilitou a otimização simultânea e eficiente das variáveis envolvidas e as características analíticas acessadas foram adequadas e provaram que o método pode ser aplicado para determinação dos metais estudados nas amostras de cerveja de diferentes tipos.

ANEXOS

PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O
CURSO DE MESTRADO

Journal of Food Measurement and Characterization
https://doi.org/10.1007/s11694-023-02034-z

ORIGINAL PAPER



Multivariate optimization of a method based on slurry sampling for determination of Fe, Mn and Zn in spirulina (*Arthrospira* sp.) samples

Uillian Mozart Ferreira Mata Cerqueira^{1,2} · Marcos Almeida Bezerra¹ · Bruno Novaes Silva¹ · Cleber Galvão Novaes¹ · Erica Raina Venâncio Almeida¹ · Sulene Alves Araújo¹

Received: 6 April 2023 / Accepted: 25 June 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

In the present work a novel methodology for the determination of Fe, Mn, and Zn by flame atomic absorption spectrometry in samples of spirulina, commercialized as a food supplement, was developed. Variables involved in the sample preparation were optimized using the Doehlert design and desirability function. The developed method presented quantification limits of 18, 5.3, and 8.6 mg kg⁻¹, precision, expressed as repeatability (%RSD, 0.5 mg kg⁻¹, N = 5) of 1.3; 1.8 and 2.3% respectively for Fe, Mn, and Zn. Accuracy was assessed by addition/recovery test, comparison with another method adopted as standard, and analysis of certified reference materials (Apple leaves NIST1515, and Pinus leaves NIST 1575a), showing that the method presents adequate accuracy for the determination of the elements studied. The concentrations of Fe, Mn, and Zn found were in the ranges from 52.5 to 836; 7.50 to 40.2, and 13.7 to 25.0 mg kg⁻¹ respectively.

Keywords Powdered spirulina · Slurry sampling · Metals · Mixture design · Doehlert design

Introduction

Arthrospira (*Spirulina*) *platensis* is a spiral-shaped filamentous cyanobacterium, classified as a blue-green microalgae. They are microorganisms generally found in tropical and subtropical regions in warm water bodies with a high content of carbonate/bicarbonate compounds, alkaline pH, and salinity. Under ideal physical conditions and in the presence of adequate nutrients, it can proliferate rapidly and generate a large mass of algae. This mass is easily collected from the aqueous medium, which enables its cultivation and commercialization on a large scale [1–3].

Spirulina has been used as a food supplement for humans and animals, being adopted as a source of proteins, minerals, B vitamins, iron, and antioxidants, such as phycocyanin

and gallic acid. Several benefits of the use spirulina in the diet have been researched, such as the prevention of heart attacks, arteriosclerosis, and stroke. Also, your consumption can avoid allergic rhinitis and diseases linked to obesity (helping with weight loss), allows the treatment of diabetes, combating anemia, and provide muscle mass gain [4–7]. Spirulina is often marketed in a dried form to prevent the product deterioration and to extend its shelf life. It is available in powder, capsule and tablet form. Ingesting more than recommended amounts of spirulina can cause nausea, vomiting, or diarrhea in some people. Allergic reactions caused by ingestion of large amounts of spirulina are, however, rare [8, 9].

Slurry sampling is a sample preparation technique based on dispersing a finely powdered solid in a liquid and introducing it into equipment aiming at elemental determination. The technique intends to minimize treatment steps and increase the analytical frequency. The following additional advantages are: minimization of the risk of contamination and loss of volatile elements, reduction in the use of corrosive reagents, application to a wide variety of inorganic and organic samples, among others [10, 11].

Slurry sampling has already been applied in the food industry for the determination of Cu, Cd, Pb, and Cr in

Marcos Almeida Bezerra
mbezerra@uesb.edu.br

¹ Departamento de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Jequié, Rua José Moreira Sobrinho s/n, Bahia 45.206-190 Jequié, Brazil

² Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo s/n, Campus da Federação/Ondina, Bahia 40.170-115 Salvador, Brazil



An introductory review on the application of principal component analysis in the data exploration of the chemical analysis of food samples

Anderson Santos Souza^{1,4} · Marcos Almeida Bezerra² · Uillian Mozart Ferreira Mata Cerqueira¹ · Calene Jesus Oliveira Rodrigues¹ · Bianca Cotrim Santos¹ · Cleber Galvão Novaes² · Erica Raina Venâncio Almeida²

Received: 16 August 2023 / Revised: 21 November 2023 / Accepted: 15 December 2023 / Published online: 3 February 2024
 © The Korean Society of Food Science and Technology 2024

Abstract

Principal component analysis (PCA) is currently one of the most used multivariate data analysis techniques for evaluating information from food analysis. In this review, a brief introduction to the theoretical principles that underlie PCA will be given, in addition to presenting the most commonly used computer programs. An example from the literature was discussed to illustrate the use of this chemometric tool and interpretation of graphs and parameters obtained. A list of recently published articles will also be presented, in order to show the applicability and potential of the technique in the food analysis field.

Keywords Principal component analysis · Multivariate analysis · Food samples

Introduction

Ensuring food quality is a demand from societies around the world. Thus, the determination of concentrations of substances and food physical and biological parameters is essential for assessing the nutrients provided and the possibility of contamination by toxic substances, parasites and pathogenic microorganisms, contributing to the population's food security. (Hou et al., 2020).

Microcomputer improvement and diffusion, besides their coupling to modern analytical instruments, has become possible, in addition to instrumental control and programming,

acquisition, storage and treatment of a large amount of information generated by food analysis. Within this panorama, the question arises of how to deal with an extensive amount of data, and extract information that is generally not perceptible to a simple visual inspection. The answer may lie in the application of chemometric methods for multivariate analysis. Multivariate data analysis makes it possible to evaluate and interpret, for example, analytical data obtained from chromatograms, spectra, signals generated by electro-analytical methods, signals from multidimensional detectors and samples for which concentrations of various chemical species or any other property that has been obtained. The

Marcos Almeida Bezerra
 mbezerra@ufsb.edu.br

Anderson Santos Souza
 asouzaq@hotmail.com

Uillian Mozart Ferreira Mata Cerqueira
 uillancercqueira@hotmail.com

Calene Jesus Oliveira Rodrigues
 calene.oliveira@gmail.com

Bianca Cotrim Santos
 biancascotrim.nutri@gmail.com

Cleber Galvão Novaes
 galvaonovaes@ufsb.edu.br

Erica Raina Venâncio Almeida
 ericaalmeidaquimica@gmail.com

¹ Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Campus Antônio Torres, Rua Homero Barros, 58, Vitória da Conquista, Bahia 45029-094, Brazil

² Departamento de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Jequié, Rua José Moreira Sobrinho, Jequié, Bahia 45206-190, Brazil

³ Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus da Federação/Ondina, Rua Barão de Góes, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

⁴ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Energia e Ambiente - INCT E&A, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GAMA, E.M.; MATOS, R.P. Cerveja: composição e métodos de determinação dos constituintes inorgânicos e orgânicos. **Revista de Educação, Ciência e Tecnologia de Almenara/ MG**, v.1, n.1, p.11-23, 2019. Disponível em: <http://recital.almenara.ifnmg.edu.br/index.php/recital>.
- [2] PIMENTA, L.B.; RODRIGUES, J.K.L.A.; SENA, M.D.D.; *et al.* A história e o processo da produção da cerveja: uma revisão. **Caderno de Ciência e Tecnologia**. Brasília, v. 37, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.35977/0104-1096.cct2020.v37.26715>.
- [3] BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Anuário da Cerveja 2022 / Ministério da Agricultura e Pecuária**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/SDA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2022>.
- [4] BRASIL. **Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019**. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>.
- [5] GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L, RODRÍGUEZ, P.M, VALLS-BELLÉS, V. Beer and Its Role Human Health. In: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. Espanha: Academic Press, 2017, 365-384. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00015-7>.
- [6] NASCENTES, C.C.; KAMOGAWA, M.Y.; FERNANDES, K.G; *et al.* Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.60, n.5, p. 749-753, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.02.012>.
- [7] POHL, P. Determination and fractionation of metals in beer: A review. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v.25, n.6, p.693–703, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02652030701772323>.

-
- [8] **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA)**. Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Brasil Food. FAPESP. [Acesso em: 29/01/2024]. Disponível em: https://www.tbca.net.br/base-dados/int_composicao_estatistica.php?cod_produto=BRC0009H.
- [9] POHL, P.; PRUSISZ, B. Fractionation analysis of manganese and zinc in beers by means of two sorbent column system and flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.71, n.4, p.1616-1623, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.039>.
- [10] ALCÁZAR, A.; PABLOS, F.; MARTÍN, M.J.; GONZÁLEZ, A.G. Multivariate characterisation of beers according to their mineral content. **Talanta**, v.57, n.1, p.45-52, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00670-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00670-1).
- [11] GAMA, E.M.; NASCENTES, C.C.; MATOS, R.P.; *et al.* A simple method for the multi-elemental analysis of beer using total reflection X-ray fluorescence. **Talanta**, v.174, n.1, p.274-278, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.059>.
- [12] WIETSTOCK, P.C.; KUNZ, T.; WATERKAMP, H. METHNER, F.-J. Uptake and Release of Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn During Beer Production. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.73, n.2, p.179-184, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0402-01>.
- [13] Li, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: PANDEY, A.; *et al.* (Org). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry. United States: **Elsevier**, p.305-351, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128191484/current-developments-in-biotechnology-and-bioengineering#book-info>.
- [14] EßLINGER, H.M.; NARZIß, L. Beer. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v.5, p.177-221, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1002/14356007.a03_421.pub2.
- [15] ARAÚJO, F.B.; SILVA, P.H.A.; MINIM, V.P.R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Food Science and Technology**, v.23, n.2, p.121-128, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200004>.

-
- [16] JUNIOR, A.A.D.; VIEIRA, A.G.; FERREIRA, T.P. Processo de produção de cerveja. **Revista Processos Químicos**, v.3, n.6, p.61-71, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.19142/rpq.v3i6>.
- [17] LAFONTAINE, S.; SENN, K.; DENNENLÖHR, J.; et al. Characterizing Volatile and Nonvolatile Factors Influencing Flavor and American Consumer Preference toward Nonalcoholic Beer. **ACS Ômega**, v.5, n.36, p.23308-23321, 2020. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c03168>.
- [18] MASSAMI, V.; et al. Produção de cervejas adocicadas: caracterização físicoquímica, sensorial e energética. **Energia na Agricultura**, v.36, n.1, p.123-130, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17224/EnergAgric.2021v36n1p123-130>
- [19] CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v.30, n.2, p.481-487, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200042>.
- [20] JOLLIFFE, I.T.; CADIMA, J. Principal componente analysis: a review and recente developments. **Philosophical Transactions Royal Society A** 374: 20150202. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202> .
- [21] KOHONEN, T. Essentials of the self-organizing map. **Neural Networks**, v. 37, p. 52-65, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2012.09.018>.
- [22] KOHONEN, T. Self-organized formation of topologically correct feature maps. **Biological Cybernetics**, v.43 n1, 59-69, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00337288>.
- [23] ALBUQUERQUE, D. Os 10 países que mais bebem cerveja. **SoCientifica**, 2022. Disponível em: <https://socientifica.com.br/paises-que-mais-bebem-cerveja/>. Acesso em: 21 outubro de 2023.
- [24] BAMFORTH, C. W. Nutritional aspects of beer: a review. **Nutrition Research**, v. 22, n. 1-2, p. 227-237, 2002. Disponível em: [https://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00360-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00360-8).

-
- [25] LEÃO, P. R. P; et al. Beer sample decomposition using a reflux system for the monoelementar determination by F AAS/AES and multielementar determination by MIP OES, **Brazilian Journal of Food Technology** **21**, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.6217>.
- [26] POHL, P. Metals in beer. **Beer and health and disease prevention**, p. 349-358, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00033-X>.
- [27] GREENACRE, M., GROENEN, P.J.F., HASTIE, T. et al. Principal component analysis. **Nat Rev Methods Primers** **2**, p. 100, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00184-w>
- [28] ABDI, H; WILLIAMS, LJ; Principal component analysis. **Wires Computational Statistics** **2**, p. 433-459, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- [29] COZZOLINO, D., POWER, A. & CHAPMAN, J. Interpreting and Reporting Principal Component Analysis in Food Science Analysis and Beyond. **Food Anal. Methods** **12**, p. 2469–2473, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01605-5>.
- [30] GIULIANI, A. The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data. **Drug Discovery Today**, v.22, n.7, p.1069-1076, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.005>.
- [31] FARRUGIA, J.; et al. Principal component analysis of hyperspectral data for early detection of mould in cheeselets. **Current Research in Food Science**, v.4, p.18-27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.12.003>.
- [32] CHAUHAN, V.S.; SHARMA, A. Studies on organoleptic properties of food products from fresh egg and egg powder through principal component analysis. **Nahrung/Food**, v.47, n.2, p.102-105, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/food.200390018>.
- [33] TADA, A; ISHIZUKI, K.; SUGIMOTO, N.; et al. Determination of the plant origin of licorice oil extract, a natural food additive, by principal component analysis based on chemical components. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.56, n.5, p.217-227, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3358/shokueishi.56.217>.

-
- [34] GRANATO, D.; et al. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v.72, p.83-90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>.
- [35] MORAWSKI, R.Z.; MIĘKINA, A. Application of principal components analysis and signal-to-noise ratio for calibration of spectrophotometric analysers of food. **Measurement**, v.79, p.302-310, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2015.10.026>.
- [36] Ismail, A.M., Sani, M.S.A., Azid, A. et al. Food forensics on gelatine source via ultra-high-performance liquid chromatography diode-array detector and principal component analysis. **SN Appl. Sci.** **3**, p. 79, 2021. Disponível em: <https://doi-org.ez356.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s42452-020-04061-7>.
- [37] LI, L.; LI, B.; ZHANG, Q.; GONG, L.; MENG, X. Use of principal component and hierarchical cluster analysis to characterize strawberries. **Oxidation Communications**, v.39, n.1, p.118–131, 2016.
- [38] NOVAES, C.G.; ROMÃO, I.L.S.; SANTOS, B.G.; et al. Screening of *Passiflora L.* mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps, **Food Chemistry**, v.233, p.507-513, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.111>.
- [39] ALVES, W.A.L.; ARAÚJO, S.A.; PESSOTA, J.H.; et al. A Methodology for Sensory Evaluation of Food Products Using Self-Organizing Maps and K-Means Algorithm. **Applied Mechanics and Materials**, v.263-266, p.2191-2194, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.263-266.2191>.

-
- [40] SILVA, E.S.; SILVA, E.G.P.; SILVA, D.S.; *et al.* Evaluation of macro and micronutrient elements content from soft drinks using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, v.273, p.9-14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.021>.
- [41] SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Data visualization of *Salmonella* Typhimurium contamination in packaged fresh alfalfa sprouts using a Kohonen network. **Talanta**, v.136, p.128-135, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.070>.
- [42] FEUDJIO, W.M.; GHALILA, H., NSANGOU, M. *et al.* Fluorescence Spectroscopy Combined with Chemometrics for the Investigation of the Adulteration of Essential Oils. **Food Analytical Methods**, v.10, p.2539–2548, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0823-4>.
- [43] ŠELIH, V. S.; ŠALA, M.; DRGAN, V. Multi-element analysis of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia. **Food Chemistry**, v.153, p.414–423, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.081>
- [44] DE BOISHEBERT, V.; GIRAUDEL, J.; MONTURY, M. Characterization of strawberry varieties by SPME–GC–MS and Kohonen self-organizing map. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.80, n.1, p.13–23, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.05.003>.
- [45] HAYKIN, S. **Neural networks and learning machines**, 3 ed. New Jersey: Pearson Education, 2009, 936p.
- [46] VESANTO, J.; ALHONIEMI, E. Clustering of the self-organizing map. **IEEE Trans Neural Netw**, v.11, n.3, p.586–600, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/72.846731>.
- [47] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.
- [48] WITT, A. Alguns conhecimentos sobre nutrição ligados à gestação e ao puerpério. **Revista de Saúde Pública**, v.5, p.97-102, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101971000100012>.

-
- [49] D'AVILA, R.F.; LUVIELMO, M.M.; MENDONÇA, C.R.B.; JANTZEN, M.M. Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 60-68, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4013/ete.2012.82.03>.
- [50] Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.2. São Paulo, 2023. [Acesso em: 13 de janeiro de 2024]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.
- [51] MAGARINI, R. Elemental analysis of beer by flame atomic absorption spectrometry with the PinAAcle 900 AAS. **PerkinElmer**, 2018. Disponível em: https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_PinAAcle-900-Elemental-Analysis-of-Beer-by-FAAS-012049_01.pdf.
- [52] ALEXA, L.; KÄNTÖR, A.; KOVÁCS, B.; CZIPA, N. Determination of micro and trace elements of commercial beers. **Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences**, v.7, n.4, p.432-436, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.4.432-436>.
- [53] RITTER, H.; KOHONEN, T. Self-organizing semantic maps. **Biological Cybernetics**, v.61, p.241–254, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00203171>.
- [54] FERREIRA, S.D.S.; DA SILVA, C.S.; DIAS, E.A.; *et al.* Evaluation of trace metal contents in soils with change of vegetation cover. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.100, n.15, p.1777–1788, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1659252>.
- [55] FERDE, M.; COSTA, V. C.; MANTOVANELI, R.; *et al.* Chemical characterization of the soils from black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivation using principal component analysis (PCA) and Kohonen self-organizing map (KSOM). **Journal of Soils and Sediments**, v.21, n.9, p.3098-3106, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11368-021-02966-3>.
- [56] ROSA, N.A.; AFONSO, J.C. A química da cerveja. **Química Nova na Escola**, v.37, n.2, p.98-105, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0104-8899.20150030>.

-
1. [57] Global Beer Consumption by Country in 2022. **Kirin Holdings**, 2023. Disponível em: https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2023/1222_04.html. Acesso em janeiro de 2024.
- [58] ASSIS, R.S.; SILVA, U.N.; SANTOS, L.B.; MELO, A.S., et al. Sample preparation strategies alternative to mineralization for elemental analysis in foods by spectroanalytical techniques – A review. **Microchemical Journal**. v. 199, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110059>
- [59] SILVA, V.H.C.; JUNIOR, A.L.S.S; SANTOS, H.M.; *et al.* Development of a Simple and Fast Procedure Based on Acid Dilution for Determination of Macro and Microelements in Guarana-Based Beverages by ICP OES. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.32, n.7, p.1467-1475, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210045>.
- [60] HOSSAIN, M.A.; ALSAID, A.A.I.; AHMEN, A.M.A.; *et al.* Trace metals in the Arabian seawater and freshwater samples in Oman by using by ICP-OES. **Journal of Clinical Trials**, v.13, n. 1, p.1-6, 2022. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access-pdfs/trace-metals-in-the-arabian-seawater-and-freshwater-samples-in-oman-by-using-by-icpoes.pdf>.
- [61] SOUSA, R.A.; SILVA, J.C.J.; BACCAN, N.; CADORE, S. Determination of metals in bottled coconut water using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, n.5, p.399-408, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.02.012>.

-
- [62] CERQUEIRA, U.M.F.M.; BEZERRA, M.A.; FERREIRA, S.L.C.; *et al.* Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review. **Food Chemistry**, v.364, n.1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130429>.
- [63] FERREIRA, S.L.C.; JUNIOR, M.M.S.; FELIX, C.S.A.; *et al.* Multivariate optimization techniques in food analysis – A review. **Food Chemistry**, v.273, p.3-8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.114>.
- [64] ARAUJO, P., JANAGAP, S. Doehlert uniform shell designs and chromatography. **Journal of Chromatography B**, V.910, P.14–21, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.019>.
- [65] CALLAO, M. P. Multivariate experimental design in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, V.62, p.86–92, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.009>.
- [66] TRINDADE, J.S.; LEMOS, V.A.; CERQUEIRA, U.M.F.M.; *et al.* Multivariate optimization of a dispersive liquid-liquid microextraction method for determination of copper and manganese in coconut water by FAAS. **Food Chemistry**, v.365, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130473>.
- [67] CERQUEIRA, U.M.F.M.; BEZERRA, M.A.; SILVA, B.N. *et al.* Multivariate optimization of a method based on slurry sampling for determination of Fe, Mn and Zn in spirulina (*Arthrospira* sp.) samples. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.17, p.5322–5329, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02034-z>.
- [68] TEODORO, M. T. F.; DIAS, F. S.; SILVA, D. G.; *et al.* Determination of copper total and speciation in food samples by flame atomic absorption spectrometry in association with solid-phase extraction with bamboo (*Bambusa vulgaris*) fiber loaded with bathocuproine. **Microchemical Journal**, v.132, p.351–357, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.01.033>.

-
- [69] KOWALSKI, C. H.; AUGUSTO, F.; GODOY, H. T. Extração de bifenilas policloradas de amostras de leite materno: otimização univariada versus planejamento experimental. *Quimica Nova*, v.36, n.3, p 468–473, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300018>.
- [70] BALLUS, C. A., MEINHART, A. D., JUNIOR, F. A. S. C.; *et al.* Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v.146, p.558–568, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.102>.
- [71] CAMPOS, A. F.; CASSELLA, R. J. Determination of acetate and formate in vegetable oils by ion chromatography after multivariate optimization of the extraction process using a Doehlert design. **Food Chemistry**, v.269, p.252–257, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.136>.
- [72] SANTOS, D. C. M. B.; CARVALHO, L. S. B.; LIMA, D. C. Determination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP OES after ultrasound-assisted extraction procedure. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.34, n.1, p.75–80, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.02.008>.