



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SIDNEI DE OLIVEIRA SOUZA

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS
PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO E DE ANIMAIS
EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

SALVADOR / BA

2019

Sidnei de Oliveira Souza

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS
PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO E DE ANIMAIS
EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo

Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiane de Andrade Maranhão (UFSC)

Este trabalho obteve auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo na modalidade Doutorado, concedida pelo CNPq através do processo nº 140972/2015-3. Além de bolsa de estágio de doutorado sanduíche no exterior concedida pela CAPES sob registro nº 88881.189612/2018-01.

SALVADOR / BA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Souza, Sidnei de Oliveira
ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS UTILIZANDO FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS DE CONSUMO
HUMANO E DE ANIMAIS EMPREGANDO TÉCNICAS
ESPECTROMÉTRICAS / Sidnei de Oliveira Souza. --
Salvador, 2019.
190 f. : il

Orientador: Rennan Geovanny Oliveira Araujo.
Coorientadora: Tatiane de Andrade Maranhão.
Tese (Doutorado - Doutorado em Química Analítica) -
Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal
da Bahia, 2019.

1. Alimentos. 2. Constituintes inorgânicos. 3.
Análise de especiação química. 4. Planejamento de
experimentos. 5. Técnicas espectrométricas. I.
Araujo, Rennan Geovanny Oliveira. II. Maranhão,
Tatiane de Andrade. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO
SIDNEI DE OLIVEIRA SOUZA

“ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS
PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO E DE ANIMAIS
EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo Rennan G.O. Araujo
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Tatiane de Andrade Maranhão Tatiane de Andrade Maranhão
Doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Daniele Cristina Muniz Batista dos Santos D. Muniz
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Victor Cerdà Martín Victor Cerdà
Doutorado em Química, Universitat de Barcelona (UIB)
Universitat de les Illes Balears

Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes Adriano de Araújo Gomes
Doutorado em Química, Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes Cleber Galvão Novaes
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Salvador, 26 de abril de 2019.

***“Sabemos muito pouco o que nós
somos e menos ainda o que
podemos ser.”***

Lord Byron

PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA POR ESTE TRABALHO

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

SOUZA, S. O.; ÁVILA, D. V. L.; CERDÀ, V.; ARAUJO, R. G. O. Otimização multivariada de um sistema MSFIA-HG-AFS para análise de especiação química de As, Sb e Se em frutos secos. **X Workshop de Quimiometria.**

SOUZA, S. O.; PEREIRA, T. R. S.; PAIXÃO, L. B.; SOARES, S. A. R.; QUEIROZ, A. F. S.; PESSOA, A. G. G.; MARANHÃO, T. A.; KORN, M. G. A.; ARAUJO, R. G. O. Otimização multivariada de método analítico para a determinação da composição mineral de rações para peixes ornamentais e de consumo humano. **VIII Workshop de Quimiometria.**

SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; BRUM, B. C. T.; GARCIA, K. S.; SOARES, S. A. R.; GARCIA, C. A. B.; ARAUJO, R. G. O. Planejamentos simultâneos usados na otimização da análise direta de caldo de cana para determinação multielementar por ICP OES, após simples diluição. **VIII Workshop de Quimiometria.**

SOUZA, S. O. Otimização multivariada de método analítico para a determinação da composição mineral de rações para peixes usando métodos baseados em plasma indutivamente acoplado. **IV Workshop do LEPETRO e POSPETRO.**

SOUZA, S. O.; PEREIRA, T. R. S.; ÁVILA, D. V. L.; SOARES, S. A. R.; PAIXÃO, L. B.; QUEIROZ, A. F. S.; PESSOA, A. G. G.; MARANHÃO, T. A.; KORN, M. G. A.; ARAUJO, R. G. O. Multivariate optimization of an analytical method for determining the mineral composition of fish feed using inductively coupled plasma-based methods. **9° Congreso Argentino de Química Analítica.**

SOUZA, S. O.; PEREIRA, T. R. S.; SOARES, S. A. R.; QUEIROZ, A. F. S.; ARAUJO, R. G. O. Otimização multivariada de método analítico para a

determinação da composição mineral de rações de peixes ornamentais e de consumo humano. **18° Encontro Nacional de Química Analítica.**

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

SOUZA, S. O.; PEREIRA, T. R. S.; ÁVILA, D. V. L.; PAIXÃO, L. B.; SOARES, S. A. R.; QUEIROZ, A. F. S.; PESSOA, A. G. G.; KORN, M. G. A.; MARANHÃO, T. A.; ARAUJO, R. G. O. Optimization of sample preparation procedures for evaluation of the mineral composition of fish feeds using ICP-based methods. *Food Chemistry* 273 (2019) 106-114.

SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; BRUM, B. C. T.; SANTOS, S. H.; GARCIA, C. A. B.; ARAUJO, R. G. O. Determination of nutrients in sugarcane juice using slurry sampling and detection by ICP OES. *Food Chemistry* 273 (2019) 57-63.

MANUSCRITO A SER ELABORADO

SOUZA, S. O.; ÁVILA, D. V. L.; CERDÀ, V.; ARAUJO, R. G. O. Chemical speciation analysis of As, Sb and Se in dried fruits using MSFIA-HG-AFS. Sendo redigido.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS NO PERÍODO

X Workshop de Quimiometria (2019)

9° Congreso Argentino de Química Analítica (2017).

IV Workshop do LEPETRO e POSPETRO (2017).

VIII Workshop de Quimiometria (2017).

18° Encontro Nacional de Química Analítica (2016).

III Workshop do LEPETRO e do POSPETRO, e I Workshop do PRH-ANP 52 (2016).

8° Congreso Argentino de Química Analítica (2015).

Seminário de Pesquisa do GRPQQ (2015).

PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO

MEDEIROS, R. L. S.; SOUZA, S. O.; ARAUJO, R. G. O.; DA SILVA, D. R.; MARANHÃO, T. A. Chlorine determination via MgCl molecule in environmental samples using high resolution continuum source furnace molecular absorption spectrometry. *Talanta* 176 (2018) 227-233.

ÁVILA, D. V. L.; SOUZA, S. O.; KORN, M. G. A.; PESSOA, A. G. G.; ARAUJO, R. G. O. Analysis of children modelling clay (toy) using inductively coupled plasma-based methods. *Talanta* 188 (2018) 273-281.

SOUZA, S. O.; SANTOS, V. S.; SANTOS, E. S.; ÁVILA, D. V. L.; NASCIMENTO, C. C. N.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; ARAUJO, R. G. O. Evaluation of the mineral content milk and yogurt types using chemometric tools. *Microchemical Journal* 143 (2018) 1-8.

ÁVILA, D. V. L.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H.; ARAUJO, R. G. O.; PASSOS, E. A. Multivariate optimization of conditions for digestion of wet feeds for dogs and cats using a closed digester block and multielement determination by ICP-OES. *Journal of AOAC International* 100 (2017) 1483-1491.

ÁVILA, D. V. L.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; ARAUJO, R. G. O.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H.; PASSOS, E. A. Determination of Zn in dry feeds for cats and dogs by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of AOAC International* 99 (2016) 1572-1575.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças para seguir sempre firme.

Aos meus pais Josafá (Bebé) e Maria Célia, pelos esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus irmãos Sidikleí, Gustavo e Érica pelo apoio. Aos meus sobrinhos Gabriela, Jennifer, Sayne, Matheus, Natiele e Natiel. À minha avó (Dona Geni) e toda a minha família, pela torcida.

À minha companheira Dayara, meus sogros Iara e Adenilson (Gordinho), meu cunhado Danilo e sua esposa Karol, por todo o apoio e momentos de descontração.

Ao meu orientador-amigo Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo, pela dedicação, paciência, apoio, orientação e momentos de descontração.

À Profa. Dra. Tatiane de Andrade Maranhão da Universidade Federal de Santa Catarina pela co-orientação deste trabalho.

Ao pessoal do LEPETRO (UFBA), em especial à Dra. Sarah Adriana Rocha Soares e à técnica Gisele Moraes, pelo apoio na infraestrutura.

Ao Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS) pela infraestrutura para a realização das análises.

A todos que compõem o Grupo de Pesquisa para Estudos em Química Analítica e Ambiental (GPEQA²), sob coordenação do Prof. Dr. Rennan Araujo.

À Profa. Dra. Amália G. G. Pessoa, pelo companheirismo e ajuda.

Aos Professores Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira e Dra. Maria das Graças de Andrade Korn pela infraestrutura.

A todos que compõem o grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente da Universidade das Ilhas Baleares (UIB), Espanha, sob a

coordenação do Prof. Dr. Víctor Cerdà pela orientação, carinho e apoio para a realização do Doutorado Sanduíche.

A todos os professores, técnicos e pessoal da limpeza do Instituto de Química da UFBA.

Ao CNPq, CAPES e FAPESB, pelo apoio para a realização do trabalho através de bolsas concedidas e do auxílio financeiro à pesquisa.

Muito Obrigado!

RESUMO

Neste trabalho serão apresentados três estudos envolvendo estratégias para análise de alimentos com a finalidade da determinação de constituintes inorgânicos em amostras de rações animais e do suco de caldo de cana, além da análise de especiação química de As, Sb e Se de frutos secos empregando a espectrometria atômica. No primeiro trabalho, foram aplicados planejamentos experimentais para otimizar as condições de decomposição das amostras assistidas por micro-ondas e operacionais de um espectrômetro para análise de rações animais. Métodos baseados em plasma acoplado indutivamente (ICP) foram utilizados para determinar as concentrações de 23 elementos em rações para peixes ornamentais e de consumo humano, ruminantes, pássaros silvestres, coelhos e equinos. Os limites de quantificação obtidos variaram entre 0,02 mg kg⁻¹ (Cd) e 76 mg kg⁻¹ (Al). A avaliação da confiabilidade dos métodos foi confirmada através da análise dos materiais de referência certificados de tecido de ostra (Oyster tissue, NIST 1566b) e chá (Tea, NCS DC 73351). As concentrações obtidas variaram entre 0,038 mg kg⁻¹ (Sb) e 3,37% (Ca) para peixes ornamentais, <LoQ (Ba) e 2,0% (Ca) para peixes de consumo humano, <LoQ (Cd, Pb e Se) e 2,0% (Ca) para coelhos, <LoQ (Cd, Pb, Sb e Se) e 2,53% (Ca) para pássaros silvestres, 0,034 mg kg⁻¹ (Sb) e 2,10% (Na) para equinos e, <LoQ (Se) e 14% (Ca) para ruminantes, estando todas de acordo com as legislações brasileira e americana. No segundo trabalho, foi empregada uma otimização multivariada de um procedimento de preparo de amostra na forma de suspensão para determinar Ca, Cu, Fe, K e Mg em amostras de caldo de cana de açúcar por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Os planejamentos fatorial fracionário e Doehlert foram aplicados para otimizar as variáveis: concentração de HNO₃, volume de H₂O₂, tempo de sonicação, vazão do gás de nebulização e a potência de radiofrequência para análise direta da amostra na forma de suspensão. O procedimento foi validado através da comparação entre os métodos de digestão e testes de adição e recuperação. O método analítico

proposto foi aplicado à análise de quatorze amostras de caldo de cana comercializadas em Aracaju, Sergipe, Brasil. Foram obtidas as concentrações médias (em mg L⁻¹) de 108 (Ca), 0,51 (Cu), 6,40 (Fe), 470 (K) e 114 (Mg). A metodologia apresentada oferece uma maneira simples, rápida, fácil e eficiente de preparo de amostras para a determinação simultânea em caldo de cana por ICP OES. Por fim, no terceiro trabalho foi realizada a análise de especiação química de As, Sb e Se em amostras de frutos secos utilizando a análise por injeção em fluxo multiseriada acoplada à espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (MSFIA-HG-AFS). Para as determinações de As e Sb, as concentrações de NaBH₄, KI e HCl foram avaliadas como fatores. Para Se, somente as concentrações de NaBH₄ e HCl foram avaliadas. As duas otimizações foram realizadas através de planejamentos Doehlert, tendo as intensidades de As, Sb e Se totais como resposta. Os limites de quantificação variaram de 0,34 (Sb total) a 15 ng g⁻¹ (As total). A exatidão e precisão dos métodos analíticos foram avaliadas através da análise do material de referência certificado e de testes de adição e recuperação. Os métodos analíticos foram aplicados em nove amostras de frutos secos, sendo que as maiores concentrações obtidas (em ng g⁻¹) foram de 8,2 ± 0,6 para Sb(III), 14,0 ± 1,2 para Sb(V), 102,5 ± 7,4 para Se(IV) e 90,5 ± 9,8 para Se(VI). As espécies As(III) e As(V) obtiveram concentrações abaixo dos LoQ para todas as amostras. Neste trabalho, os métodos analíticos para a determinação das concentrações totais de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em alimentos de consumo humano e animal, mostraram-se satisfatórios, podendo ser empregados para análises de rotina para avaliar a composição química dos alimentos.

Palavras chave: Alimentos; Rações animais; Análise de especiação química; ICP OES; ICP-MS; MSFIA-HG-AFS; Planejamento de experimentos; Análise multivariada de dados; Segurança de alimentos.

Abstract

In this work three studies were developed involving strategies for food analysis for determination of inorganic constituents in animal feeds and sugarcane juice samples, as well as, the chemical speciation analysis of As, Sb and Se of dried fruits using atomic spectrometry. In the first work, experimental designs were applied to optimize the conditions of microwave-assisted sample decomposition and operational of spectrometer for animal feeds analysis. Inductively coupled plasma (ICP) based methods were used to determine the concentrations of 23 elements in feed for ornamental and human fishes, ruminants, wild birds, rabbits and equines. The limits of quantification obtained ranged from 0.02 mg kg⁻¹ (Cd) to 76 mg kg⁻¹ (Al). The reliability to the methods was confirmed by the analysis of certified reference material (CRM) of oyster tissue (NIST 1566b) and tea (NCS DC 73351). The concentrations obtained ranged between 0.038 mg kg⁻¹ (Sb) and 3.37% (Ca) for ornamental fishes, <LoQ (Ba) and 2.0% (Ca), <LoQ (Cd, Pb and Sb) and 2.0% (Ca) for rabbits, <LoQ (Cd, Pb, Sb and Se) and 2,53% (Ca) for wild birds, 0.034 mg kg⁻¹ (Sb) and 2.10% (Na) for equines and, <LoQ (Se) and 14% (Ca) for ruminants, all of which are in accordance with Brazilian and American legislation. In the second work, a multivariate optimization of a sample preparation procedure as slurry was used to determine Ca, Cu, Fe, K and Mg in sugarcane juice samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The fractional factorial and Doehlert designs were applied to optimize the variables: HNO₃ concentration, H₂O₂ volume, sonication time, nebulizer gas flow and radiofrequency power for direct analysis of the sample as slurry. The procedure was validated by comparing digestion with addition and recovery tests. The proposed analytical method was applied to the analysis of fourteen samples of sugarcane juice marketed in Aracaju, Sergipe, Brazil. The mean concentrations (in mg L⁻¹) of 108 (Ca), 0.51 (Cu), 6.40 (Fe), 470 (K) and 114 (Mg) were obtained. The methodology presented offers a simple, fast, easy and efficient of sample preparation form simultaneous determination in sugarcane juice by ICP OES. Finally, in the third work the chemical speciation analysis of As, Sb and Se in

dried fruit samples was performed using multi-syringe flow injection analysis hydride generation atomic fluorescence spectrometry (MSFIA-HG-AFS). For As and Sb determinations, the concentrations of NaBH₄, KI and HCl were evaluated as factors. For Se, only concentrations of NaBH₄ and HCl were evaluated. The two optimizations were performed through Doehlert designs, having the intensities of As, Sb and Se as response. Limits of quantification ranged from 0.34 (Sb total) to 15 ng g⁻¹ (As total). The accuracy and precision of the analytical methods were evaluated through the analysis of certified reference material and addition and recovery tests. The analytical methods were applied to nine dried fruit samples, and the highest concentrations (in ng g⁻¹) were 8.2 ± 0.6 for Sb(III), 14.0 ± 1.2 for Sb(V), 102.5 ± 7.4 for Se(IV) and 90.5 ± 9.8 for Se(VI). The As(III) and As(V) species obtained concentrations below the LoQ for all samples. In this work, analytical methods for the determination of total concentrations of essential and potentially toxic elements in food and feed, have been satisfactory and can be used for routine analysis to evaluate the chemical composition of foods.

Keywords: Foods; Feeds; Chemical speciation analysis; ICP OES; ICP-MS; MSFIA-HG-AFS; Factorial design; Multivariate data analysis; Food safety.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Ingestão diária recomendada de alguns minerais para adultos, gestantes, lactantes e crianças de 1 - 3 anos, 4 - 6 anos e 7 - 10 anos.....	7
Tabela 1.2. Variação dos limites máximos permitidos para os contaminantes em gêneros alimentícios de acordo com as legislações brasileira, europeia e da FAO em conjunto com a OMS.....	10
Tabela 1.3. Elementos necessários para alguns animais.....	14
Tabela 1.4. Níveis de garantia máximos e mínimos exigidos pelo MAPA para <i>pets</i> e <i>non-pets</i> , expressos em amostras comerciais para os elementos presentes em alimentos para animais de estimação e de abate.....	16
Tabela 2.1. Condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica utilizado nas análises das amostras de rações animais.....	32
Tabela 2.2. Matriz do planejamento fatorial fracionário com triplicata do ponto central usada na avaliação das condições para a digestão da amostra de ração para peixe ornamental por radiação assistida por micro-ondas. Valores codificados / reais.....	40
Tabela 2.3. Matriz do planejamento Doehlert para otimização das condições operacionais do espectrômetro.....	43
Tabela 2.4. Valores críticos obtidos para o planejamento Doehlert nas três situações (amostra de ração comercial, solução multielementar e múltipla resposta).....	46
Tabela 2.5. Parâmetros obtidos para as técnicas de ICP OES e ICP-MS nas análises de rações animais.....	48
Tabela 2.6. Limites de detecção relatados na literatura em matrizes semelhantes.....	50
Tabela 2.7. Resultados obtidos para as análises dos materiais de referência certificados por ICP OES e ICP-MS.....	51
Tabela 2.8. Resultados obtidos para as concentrações encontradas em ração animal utilizando ICP OES.....	54
Tabela 2.9. Resultados obtidos para as concentrações encontradas em ração animal utilizando ICP-MS. Concentrações expressas em mg kg ⁻¹	58
Tabela 2.10. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para peixes ornamentais.....	62

Tabela 2.11. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para peixes de consumo humano.....	64
Tabela 2.12. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para coelhos.....	65
Tabela 2.13. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para pássaros silvestres.....	67
Tabela 2.14. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para equinos.....	68
Tabela 2.15. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para ruminantes.....	70
Tabela 2.16. Pesos das variáveis para as três primeiras componentes principais.....	75
Tabela 3.1. Composição nutricional do caldo de cana de açúcar, de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.....	80
Tabela 3.2. Ingestão diária recomendada (IDR) de Ca, Cu, Fe e Mg por indivíduo e grupo populacional.....	81
Tabela 3.3. Características e condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente utilizado nas análises....	85
Tabela 3.4. Matriz para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} usado na otimização do processo.....	89
Tabela 3.5. Valores de contrastes e confundimentos para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}	92
Tabela 3.6. Matriz do Planejamento Doehlert para as quatro variáveis: vazão do gás de nebulização (VGN), volume de peróxido de hidrogênio ($V_{H_2O_2}$), tempo de sonicação (T_{sonic}) e potência de radiofrequência (PRF).....	95
Tabela 3.7. Valores de limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) obtidos para os métodos de análise na forma de suspensão e digestão.....	101
Tabela 3.8. Resultados obtidos de concordância e desvio padrão relativo (RSD) por comparação de métodos, e avaliação usando testes de adição e recuperação para as análises de caldo de cana (amostra 4) por ICP OES....	103
Tabela 3.9. Concentrações de Ca, Cu, Fe, K e Mg obtidas em amostras de caldo de cana na forma de suspensão por ICP OES, após um simples pré-tratamento.....	105
Tabela 3.10. Comparação das concentrações médias obtidas nas amostras de caldo de cana com os valores reportados pela tabela TACO.....	107

Tabela 4.1. Programa de temperatura do micro-ondas para digestão das amostras de frutos secos.....	114
Tabela 4.2. Características instrumentais dos métodos propostos para a análise de especiação química de As, Sb e Se inorgânicos em frutos secos.	117
Tabela 4.3. Sequência operacional do procedimento automatizado para a análise de especiação química utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS.....	118
Tabela 4.4. Planejamento Doehlert com três variáveis obtido para a análise de especiação química de As e Sb totais utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS..	122
Tabela 4.5. Análise de variância (ANOVA) obtida para o planejamento Doehlert para os elementos As e Sb totais.....	125
Tabela 4.6. Planejamento Doehlert obtido para a análise de especiação química de Se usando o sistema MSFIA-HG-AFS.....	126
Tabela 4.7. Análise de variância (ANOVA) obtida para o planejamento Doehlert com duas variáveis para geração do hidreto de Se.....	129
Tabela 4.8. Limites de detecção e quantificação obtidos para análise de As(III) e total, Sb(III) e total e Se(IV) e total utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS....	130
Tabela 4.9. Resultados obtidos para As, Sb e Se totais, após as análises do material de referência certificado de músculo de peixe (DORM-2, Dogfish muscle) para avaliação da exatidão e precisão do método MSFIA-HG-AFS..	131
Tabela 4.10. Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação para as espécies As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Se(IV) e Se(VI) em uma amostra de frutos secos (amostra 9).....	132
Tabela 4.11. Resultados da análise de especiação química em amostras de frutos secos para a determinação de As(III) e (V), Sb(III) e (V), e Se(IV) e (VI) utilizando MSFIA-HG-AFS. Concentração em ng g ⁻¹	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} usado para avaliar as condições de digestão das amostras por radiação assistida por micro-ondas.....	39
Figura 2.2. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento Doehlert usado para avaliar as condições operacionais do espectrômetro, sendo utilizada a MR para avaliação.....	44
Figura 2.3. Gráfico de contorno obtido entre a potência de radiofrequência e a vazão do gás de nebulização para o planejamento Doehlert para a amostra comercial de ração para peixes ornamentais.....	45
Figura 2.4. Comparação das concentrações médias dos macroelementos nos cinco tipos de ração animal.....	71
Figura 2.5. Comparação das concentrações médias dos microelementos nos cinco tipos de ração animal.....	72
Figura 2.6. Comparação das concentrações médias dos elementos traço nos cinco tipos de ração animal.....	73
Figura 2.7. Gráficos tridimensionais para a PC3 x PC2 x PC1 para os elementos (a) e as amostras de ração animal (b).....	76
Figura 2.8. Dendograma obtido para as amostras de ração animal através do método de ligação de Ward e da distância Euclidiana.....	77
Figura 3.1. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}	91
Figura 3.2. Análise de regressão linear para os valores preditos versus os valores observados para a razão Mg II / Mg I obtida a partir do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}	93
Figura 3.3. Superfície de resposta gerada para o planejamento Doehlert proposto, para as variáveis vazão do gás de nebulização (VGN) e potência de radiofrequência (PRF), através da múltipla resposta (MR).....	99
Figura 3.4. Gráficos de contorno obtidos para o planejamento Doehlert (a) VGN <i>versus</i> PRF e (b) PRF <i>versus</i> $V_{H_2O_2}$	100
Figura 4.1. Esquema do sistema MSFIA-HG-AFS utilizado para análise de especiação química de As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Se(IV) e Se(VI) em frutos secos.....	116
Figura 4.2. Gráfico de contorno obtido para as variáveis concentração de $NaBH_4$ e concentração de KI, do planejamento Doehlert para a análise de especiação química de As e Sb.....	124

Figura 4.3. Gráfico de contorno obtido para as variáveis concentração de NaBH₄ e concentração de HCl, do planejamento Doehlert para a análise de especiação química de As e Sb.....124

Figura 4.4. Gráfico de Pareto obtido para o Planejamento Doehlert usado para a otimização dos parâmetros de análise de especiação química de Se usando o sistema MSFIA-HG-AFS.....127

Figura 4.5. Gráfico de contorno obtido para as variáveis concentração da solução de NaBH₄ e concentração da solução de HCl, do planejamento Doehlert para a análise de especiação química de Se.....128

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAFCO: Associação Americana Oficial de Controle de Alimentos (do inglês: *The Association of American Feed Control Officials*).

AAS: espectrometria de absorção atômica (do inglês: *atomic absorption spectrometry*).

AEC: cromatografia por troca iônica (do inglês: *anion-exchange chromatography*).

AFS: espectrometria de fluorescência atômica (do inglês: *atomic fluorescence spectrometry*).

ANOVA: análise de variância (do inglês: *analysis of variance*).

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ATSDR: Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (do inglês: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*).

BEC: concentração equivalente ao sinal de fundo (do inglês: *background equivalente concentration*).

CCAB: Comitê do Codex Alimentarius do Brasil.

CRM: material de referência certificado (do inglês: *certified reference material*).

CV AFS: espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (do inglês: *cold vapour atomic fluorescence spectrometry*).

CVG: geração de vapor químico (do inglês: *chemical vapour generation*).

DMA: dimetilarsinato (do inglês: *dimethylarsinate*).

EUA: Estados Unidos da América.

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

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (do inglês: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*).

FIA: análise por injeção em fluxo (do inglês: *flow injection analysis*).

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

GF AAS: espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês: *grafite furnace atomic absorption spectrometry*).

HCA: análise de agrupamento hierárquico (do inglês: *hierarchical cluster analysis*).

HG: geração de hidretos (do inglês: *hydride generation*).

HG-AFS: espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (do inglês: *hydride generation atomic fluorescence spectrometry*).

HG-CT-AAS: espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos após armadilha criogênica (do inglês: *hydride generation cryogenic trapping atomic absorption spectrometry*).

HR-CS-GF AAS: espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e atomização em forno de grafite (do inglês: *high resolution continuum source grafite furnace atomic absorption spectrometry*).

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês: *International Agency for Research on Cancer*).

ICP: plasma acoplado indutivamente (do inglês: *inductively coupled plasma*).

ICP OES: espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês: *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*).

ICP-MS: espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês: *inductively coupled plasma mass spectrometry*).

IDR: ingestão diária recomendada.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union Pure and Applied Chemistry*).

LoD: limite de detecção (do inglês: *limit of detection*).

LoQ: limite de quantificação (do inglês: *limit of quantification*).

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MCFIA: análise por injeção em fluxo multi-comutado (do inglês: *multicommutated flow injection analysis*).

MERCOSUL: Mercado Comum do Sul.

MMA: monometilarsonato (do inglês: *monomethylarsonate*).

MP-AES: espectrometria de emissão atômica com plasma de micro-ondas (do inglês: *microwave plasma atomic emission spectrometry*).

MR: múltipla resposta.

MSFIA: análise por injeção em fluxo multiseringa (do inglês: *multisyringe flow injection analysis*).

MSFIA-HG-AFS: espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos acoplada à análise por injeção em fluxo multiseringa (do inglês: *multisyringe flow injection analysis hydride generation atomic fluorescence spectrometry*).

OMS: Organização Mundial da Saúde.

ONU: Organização das Nações Unidas.

PCA: análise de componentes principais (do inglês: *principal component analysis*).

PRF: potência de radiofrequência.

PTFE: politetrafluoroetileno.

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

SBR: razão sinal-ruído (do inglês: *signal-to-background ratio*).

SGL: separador gás-líquido.

SIA: análise por injeção sequencial (do inglês: *sequential injection analysis*).

SIMAAS: espectrometria de absorção atômica simultânea (do inglês: *simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry*).

TACO: Tabela brasileira de composição de alimentos.

VGN: vazão do gás de nebulização.

SUMÁRIO

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas e Abreviaturas

Introdução	1
Capítulo 1. Revisão da literatura	4
1.1. Segurança alimentar versus segurança de alimentos: conceitos e perspectivas para alimentação humana e de animais.....	4
1.2. Alimentos para consumo humano	6
1.3. Alimentos para consumo animal	13
1.4. Métodos de preparo de amostra	18
1.4.1. Decomposição ácida em sistema fechado	18
1.4.2. Extração assistida por ultrassom.....	20
1.5. Métodos baseados em plasma acoplado indutivamente	21
1.6. Epectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos e análise por injeção em fluxo multiseringa.....	23
1.7. Análise de especiação química	25
1.8. Planejamento de experimentos	26
1.9. Análise multivariada de dados.....	27
1.10. Objetivos.	28
Capítulo 2. Otimização de procedimentos de preparo de amostra para avaliação da composição mineral de rações animais usando métodos baseados em ICP e análise multivariada de dados.....	29
2.1. Introdução.	29
2.2. Objetivos específicos.....	30

2.3. Procedimento experimental.....	31
2.3.1. Instrumentação.....	31
2.3.2. Materiais, reagentes e soluções	33
2.3.3. Preparo das amostras de ração animal	34
2.3.4. Controle de qualidade	36
2.3.5. Otimização das condições experimentais	36
2.4. Resultados e discussão.....	37
2.4.1. Otimização das condições de decomposição das rações animais.....	37
2.4.2. Avaliação das condições operacionais do ICP OES através de um planejamento Doehlert.	42
2.4.3. Validação dos métodos propostos baseados em ICP para análise de rações animais.....	47
2.4.4. Aplicação dos métodos analíticos em amostras de ração animal.	53
2.4.5. Análise multivariada de dados.....	73
2.4.5.1. Análise de componentes principais	73
2.4.5.2. Análise de agrupamento hierárquico.	77
2.5. Considerações finais.	78
Capítulo 3. Determinação de nutrientes em caldo de cana usando análise direta na forma de suspensão e detecção por ICP OES.....	79
3.1. Introdução.	79
3.2. Objetivos específicos.....	84
3.3. Procedimento experimental.....	84
3.3.1. Instrumentação.....	84
3.3.2. Reagentes, soluções e amostras.	86
3.3.3. Procedimentos de preparo das amostras.....	86
3.3.3.1. Preparo da amostra na forma de suspensão por simples diluição.	86
3.3.3.2. Digestão das amostras.	87
3.3.3.3. Planejamento experimental.	87
3.4. Resultados e discussão.....	88

3.4.1. Otimização da análise de amostra de caldo de cana na forma de suspensão.....	88
3.4.2. Parâmetros analíticos do método proposto.....	101
3.4.2.1. Limites de detecção e de quantificação.....	101
3.4.2.2. Exatidão e precisão.....	101
3.4.3. Aplicação do método otimizado em amostras de caldo de cana <i>in natura</i> após simples diluição.....	104
3.5. Considerações finais.....	107
Capítulo 4. Análise de especiação química de As, Sb e Se inorgânicos em frutos secos utilizando MSFIA-HG-AFS.....	109
4.1. Introdução.....	109
4.2. Objetivos específicos.....	112
4.3. Procedimento experimental.....	112
4.3.1. Reagentes e soluções.....	112
4.3.2. Coleta e pré tratamento das amostras de frutos secos.....	113
4.3.3. Sistema MSFIA acoplado à detecção por HG-AFS.....	115
4.3.4. Procedimento para determinação de As, Sb e Se utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS.....	117
4.4. Resultados e discussão.....	121
4.4.1. Otimização das condições experimentais para a análise de especiação química de As e Sb.....	121
4.4.2. Otimização das condições experimentais para a análise de especiação química de Se.....	125
4.4.3. Validação do sistema MSFIA-HG-AFS.....	129
4.4.3.1. Limites de detecção e de quantificação.....	129
4.4.3.2. Exatidão e precisão.....	130
4.4.4. Aplicação analítica em amostras de frutos secos.....	132
4.5. Considerações finais.....	135
Capítulo 5. Conclusões.....	136
Perspectivas de trabalhos.....	137
Referências.....	138

Introdução

A determinação de elementos químicos em amostras de alimentos tem evidenciado uma das principais preocupações relacionadas a este tipo de matriz, que é a segurança de alimentos, que pode impactar diretamente a qualidade de vida tanto dos seres humanos, quanto dos animais. Na literatura, há artigos de revisão que abordam fraudes e adulterações em alimentos, como o trabalho publicado por Valdés *et al.* (2018) no qual constataram que as fraudes em produtos de origem animal e vegetal, incluindo carnes, peixes, frutos do mar, produtos lácteos, óleos vegetais e frutos secos, tem crescido nos últimos anos, podendo acarretar sérios problemas para os consumidores.

Sendo assim, a crescente aplicação de diferentes estratégias de preparo de amostra e desenvolvimento de métodos de determinação de elementos químicos presentes em matrizes de alimentos tem papel fundamental na busca por produtos cada vez mais seguros. Para isto, técnicas analíticas específicas para a determinação de constituintes inorgânicos que apresentam precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade, têm sido empregadas, tais como a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG AFS), com a finalidade da quantificação de concentrações entre ng L^{-1} e mg L^{-1} (da Costa *et al.*, 2013; de Santana *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019).

Para auxiliar na otimização do preparo de amostra e das técnicas espectroanalíticas têm sido utilizadas as técnicas de planejamento de experimentos, envolvendo os planejamentos fatorial completo e fracionário, e matriz Doehlert com a finalidade da redução de experimentos e reagentes quando comparados aos métodos univariados. Além dessas ferramentas quimiométricas, existem as estratégias que permitem avaliar tendências ou similaridades através da análise multivariada de dados, como a análise de

componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), que têm sido utilizadas para averiguar a autenticação da origem de um produto em termos geográficos, botânicos ou processo de fabricação, fornecendo a ausência de adulteração ou a presença de substâncias ou elementos químicos não declarados (Callao & Ruisánchez, 2018).

Como a informação da concentração total do elemento não é mais uma informação soberana na avaliação da essencialidade ou não essencialidade de um dado elemento, a aplicação da análise de especiação química vem sendo utilizada para verificar a quantidade que está sendo absorvida e a forma na qual o analito se encontra, podendo avaliar a sua toxicidade ou não, para uma avaliação mais realista acerca dos seus danos para a saúde dos seres humanos e dos animais.

Logo, a presente Tese de doutorado apresenta quatro capítulos. No primeiro, revisará as informações contidas nas bases de dados com a finalidade do levantamento de informações e resultados obtidos pelos trabalhos científicos sobre alimentos de consumo humano e de animais voltados para desenvolvimentos de métodos analíticos, uso de ferramentas quimiométricas e valores máximos permitidos pelas agências reguladoras brasileiras e outros países, como Estados Unidos e da União Européia.

No capítulo 2, através da utilização de planejamento de experimentos e das técnicas utilizando o plasma indutivamente acoplado (ICP), foram otimizados métodos analíticos para a determinação de vinte e três elementos químicos presentes em rações animais empregando ICP OES e ICP-MS, e a aplicação das técnicas de reconhecimento de padrões como PCA e HCA para avaliar tendências e similaridades entre as amostras para peixes ornamentais e de consumo humano, ruminantes, pássaros silvestres, coelhos e equinos

No capítulo 3 foram utilizados planejamentos de experimentos para otimizar um procedimento de preparo da amostra na forma de suspensão para determinação de Ca, Cu, Fe, K e Mg em caldo de cana *in natura* por ICP OES.

No capítulo 4 foi realizada a análise de especiação química de As, Sb e Se em frutos secos após a otimização das condições de geração dos hidretos por meio de planejamentos Doehlert e determinação por análise por injeção em fluxo multiseriada acoplada à espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (MSFIA-HG-AFS). Este trabalho foi desenvolvido durante um estágio de doutorado sanduíche na Universidade das Ilhas Baleares, em Palma de Mallorca, Espanha.

Por fim, o estudo mostra conclusões relevantes obtidas por este trabalho com a finalidade de abordar a síntese dos três trabalhos desenvolvidos para análise de alimentos de consumo humano e de animais usando técnicas espectroanalíticas. Além de perspectivas de trabalhos que potencialmente podem ser derivados desta Tese de Doutorado.

Capítulo 1. Revisão da literatura

1.1. Segurança alimentar versus segurança de alimentos: conceitos e perspectivas para alimentação humana e de animais

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), o termo “segurança alimentar (*food security*)” corresponde às condições em que todas as pessoas, em todas as épocas e no mundo todo, tenham o direito de acesso físico, social e econômico a alimentos em quantidade e qualidade nutricional adequadas para que possam obter uma vida ativa e saudável (FAO^a, 2016). Este termo teve origem após as guerras mundiais que devastaram a Europa, quando a produção de alimentos ficou impossibilitada.

A FAO estima que em 2015 cerca de 793 milhões de pessoas em todo o mundo sofreram com a falta de alimento para conduzir uma vida ativa e saudável (FAO^b, 2015). No mesmo ano, a FAO divulgou um relatório intitulado “*The State of Food Insecurity in the World 2015*” onde estima que na América Latina havia um total de 34,3 milhões de pessoas subalimentadas e no Brasil, ainda há cerca de 3,4 milhões (FAO^c, 2015).

Já o termo “segurança de alimentos (*food safety*)” que se refere à garantia de acesso a alimentos cada vez mais seguros, sem a presença de contaminantes químicos, físicos ou biológicos, surgiu da preocupação com a transmissão de doenças, devido ao abastecimento cada vez mais globalizado (Reino Unido, 2009). Atualmente são conhecidas cerca de 250 doenças em humanos relacionadas à presença desses contaminantes em alimentos (Khan *et al.*, 2017), que são responsáveis pela maioria da mortalidade e morbidade de cerca de 30% da população mundial dos países industrializados de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2014).

A OMS juntamente com a FAO alerta aos países com relação à segurança alimentar e segurança de alimentos através do “*Codex Alimentarius*” ou “*food code*” que é um conjunto de normas, códigos de práticas, diretrizes e outras recomendações reconhecidas internacionalmente, que estão relacionadas com os alimentos e que abrangem todos os principais alimentos e processos (OPAS, 2015).

No Brasil, há o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB) que atua na elaboração e atualização da legislação nacional de alimentos com base nas diretrizes do *Codex Alimentarius* internacional (Brasil^a, 2016). Esse guia foi estabelecido pela ONU em 1963 com o intuito de assegurar que o comércio regional e mundial de alimentos não afetasse a saúde dos consumidores, cobrindo 99% da população mundial. Atualmente, o comércio internacional de alimentos movimenta cerca de 200 bilhões de dólares anualmente, como resultado de bilhões de toneladas de alimentos produzidos, comercializados e transportados (FAO^d, 2016).

Esses conceitos de certa forma também acabam se expandindo para a alimentação dos animais, sejam eles de estimação ou que farão parte da cadeia alimentar, por causa das doenças que podem ser veiculadas através do contato com os animais ou ingestão de produtos de origem animal. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa N°4, de 01 de janeiro de 2007, aprovou o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e o roteiro de inspeção, visando garantir uma maior segurança dos alimentos (Brasil^b, 2007).

Neste sentido, pode-se verificar que existe uma preocupação mundial referente à qualidade dos alimentos através de programas de conscientização em toda a cadeia alimentar, dos agricultores e/ou fornecedores até os consumidores, bem como de regulamentações que assegurem cada vez mais uma maior qualidade dos alimentos de consumo humano e animal.

1.2. Alimentos para consumo humano

Diante da crescente preocupação com uma alimentação equilibrada, torna-se cada vez mais importante conhecer a composição dos alimentos que farão parte da alimentação. Com o intuito de fornecer informações nutricionais dos alimentos consumidos em todo o Brasil, surgiu o projeto da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo (TACO, 2011).

Em 2004, foi lançada a primeira versão da TACO constituída por 198 alimentos, a segunda versão foi composta de 495 alimentos e a última versão lançada conta com 597 alimentos (TACO, 2011). A informação nutricional permitirá que a população possa suprir a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais, de acordo com a Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A **Tabela 1.1** mostra os valores de IDR para minerais referentes a adultos, gestantes, lactantes e crianças de 1 - 3 anos, 4 - 6 anos e 7 - 10 anos (Brasil^d, 2005), onde para Ca, por exemplo, a IDR é de 1000, 1200, 1000, 500, 600 e 700 mg, respectivamente.

Tabela 1.1. Ingestão diária recomendada de alguns minerais para adultos, gestantes, lactantes e crianças de 1 - 3 anos, 4 - 6 anos e 7 - 10 anos. Adaptada de (Brasil^d, 2005).

Mineral	Adultos	Gestante	Lactantes	Crianças	Crianças	Crianças
				1 - 3 Anos	4 - 6 Anos	7 - 10 Anos
Ca (mg)	1000	1200	1000	500	600	700
Cr (µg)	35	30	45	11	15	15
Cu (µg)	900	1000	1300	340	440	440
Fe (mg)	14	27	15	6	6	9
Mg (mg)	260	220	270	60	73	100
Mn (mg)	2,3	2,0	2,6	1,2	1,5	1,5
P (mg)	700	1250	1250	460	500	1250
Se (µg)	34	30	35	17	21	21
Zn (mg)	7	11	9,5	4,1	5,1	5,6

Dentre os alimentos que compõem a TACO, há cereais e derivados: arroz, milho, bolo, farinha, pão, etc.; verduras, hortaliças e derivados: alface, batata, cebolinha, feijão, extrato de tomate, caruru, etc.; frutas e derivados: banana, cacau, fruta-pão, goiabada, suco de uva envasado, etc.; gorduras e óleos: azeites de dendê e oliva, margarina, óleo de soja, manteiga, etc.; pescados e frutos do mar: atum, bacalhau, caranguejo, pescada, salmão, etc.; carnes e derivados: variados cortes de carne bovina e suína, partes de frango, apresuntado, caldo de carne, mortadela, peru, etc.; leite e derivados: iogurte, leites de vaca e cabra, queijos, etc.; bebidas alcoólicas e não alcoólicas: café, caldo de cana, água de coco, cerveja, refrigerante, etc.; ovos e derivados: ovos de codorna e galinha, omelete, etc.; produtos açucarados: achocolatado em pó,

açúcar cristal, mascavo e refinado, mel de abelha, rapadura, etc.; miscelâneas: café, fermentos em pó, biológico, sal dietético e grosso, tempero a base de sal, etc.; outros alimentos industrializados: azeitona, chantilly, leite de coco, maionese, etc.; alimentos preparados: acarajé, camarão à baiana, feijoada, maniçoba, cuscuz, vatapá, etc.; leguminosas e derivados: amendoim, feijão fradinho, lentilha, farinha de soja, queijo de soja (tofu), etc.; nozes e sementes: castanha-de-caju, gergelim, linhaça, noz, etc. (TACO, 2011).

Nestes alimentos há o registro da presença de proteínas, lipídeos, colesterol, carboidratos, fibra alimentar, cinzas, retinol, tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, vitamina C, além de macroelementos (Ca, K, Mg, Na e P) e microelementos (Cu, Fe, Mn e Zn) (TACO, 2011).

Entretanto, no Brasil a literatura já reporta outros elementos químicos em diversos tipos de alimentos. De Souza *et al.* (2016) encontraram Mn em amostras de fruta pão. Da Silva *et al.* (2013) estabeleceram as concentrações de Sr em amostras de arroz. Silva *et al.* (2012) encontraram níveis de Hg em amostras de arroz. Trindade *et al.* (2015) encontraram concentrações de Ni em amostras de óleo de soja, milho e canola. Milani *et al.* (2016) quantificaram Al, As, Ba, Cd, Cr, Ni, Pb e Se em amostras de chá de *Camellia sinensis*. De Oliveira^a *et al.* (2017) determinaram As, Bi, Cd, Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, In, La, Lu, Nd, Pb, Pr, Sc, Se, Sm, Tm, Y e Yb em amostras de mel.

Medeiros *et al.* (2014) determinaram as concentrações de Fe, Mn, Zn, Co, As, Cd e Pb em amostras de 11 espécies de peixes comercializados no Rio de Janeiro. Morgano *et al.* (2011) encontraram concentrações de As, Cd, Cr, Hg e Pb em amostras de peixes do Japão comercializados no mercado de São Paulo. Muller *et al.* (2016) quantificaram as concentrações de B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Sr e Zn em amostras de leite em pó. Dentre estes elementos reportados na literatura, há a presença de contaminantes para a saúde humana tais como As, Cd, Hg, Pb, dentre outros, bem como, elementos químicos tidos como essenciais para a nutrição e bom

funcionamento vital do organismo, tais como Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, dentre outros.

No Brasil, através do decreto nº 55871, de 26 de março de 1965 e da resolução do Ministério da Saúde, a RDC N°42, de 29 de agosto de 2013, que dispõe sobre o regulamento técnico do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), são apresentados os limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos (Brasil^e, 1965; Brasil^g, 2013).

Na União Europeia, o regulamento da comissão “*Commission Regulation (EC) nº 1881/2006 of 19 December 2006*” e suas alterações “*Comission Regulation (EC) nº 629/2008*” e “*Comission Regulation (EU) nº 488/2014*” fixaram os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios (União Europeia, 2014). Por outro lado, a FAO e a OMS estabeleceram limites máximos permitidos para os contaminantes em alimentos através do *Codex Alimentarius* (FAO^e, 2009). Na **Tabela 1.2** estão os elementos regulamentados pelas legislações brasileiras, europeia e da FAO em conjunto com a OMS.

Tabela 1.2. Variação dos limites máximos permitidos para os contaminantes em gêneros alimentícios de acordo com as legislações brasileira, europeia e da FAO em conjunto com a OMS.

	Legislação Brasileira	Legislação Europeia	FAO e OMS
Elemento	Variação dos limites máximos (mg kg ⁻¹)	Variação dos limites máximos (mg kg ⁻¹)	Variação dos limites máximos (mg kg ⁻¹)
As	Concentração de 0,01 para gelos comestíveis a 1,0 para miúdos comestíveis exceto fígado e rins; fígado de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral; rins de bovinos, ovinos, suínos e caprinos; peixes crus, congelados ou refrigerados; moluscos cefalópodes; moluscos bivalves, e crustáceos	---	Concentração de 0,01 para águas minerais naturais a 0,5 para sal de cozinha
Cd	Concentração de 0,01 para sorvetes de água saborizados a 2,0 para moluscos cefalópodes e bivalves	Concentração de 0,005 em fórmulas líquidas a partir de proteínas ou hidrolisados de proteínas do leite de vaca a 3,0 para suplementos alimentares que consistam exclusiva ou principalmente em algas secas, produtos derivados de algas ou moluscos bivalves secos	Concentração de 0,003 em águas minerais naturais a 2 para moluscos bivalves e cefalópodes

Tabela 1.2. (Continuação).

Cr	Concentração de 0,10 em qualquer alimento	---	---
Cu	Concentração de 5,00 para bebidas alcólicas fermentadas, refrescos e refrigerantes a 30,00 para sucos de frutas e xaropes naturais, e outros alimentos	---	---
Hg	Concentração de 0,50 para peixes, exceto predadores; moluscos cefalópodes e bivalves; e crustáceos a 1,0 para peixes predadores	Concentração de 0,10 para suplementos alimentares a 1,0 para a parte comestível de alguns peixes como tamboril, peixe-lobo riscado, enguia, atuns, etc.	Concentração de 0,001 em águas minerais naturais a 0,1 para sal de cozinha
Ni	Concentração de 0,10 para bebidas alcólicas fermentadas, refrescos e refrigerantes a 5,00 para outros alimentos	---	---
Pb	Concentração de 0,01 para gelos comestíveis a 2,0 para sal de consumo humano	Concentração de 0,020 para leite cru, tratado termicamente e para o fabrico de produtos lácteos, fórmulas para lactantes e fórmulas de transição a 3,0 para suplementos alimentares	Concentração de 0,01 em águas minerais naturais e fórmula infantil a 1,5 para tomates transformados em concentrados

Tabela 1.2. (Continuação).

Sb	Concentração de 0,20 para bebidas alcólicas fermentadas e fermento-destiladas, refrescos e refrigerantes a 2,0 para outros alimentos	---	---
Se	Concentração de 0,05 para alimentos líquidos a 0,30 para alimentos sólidos	---	---
Sn	Concentração de 150 para bebidas enlatadas (incluídos os sucos de frutas e sucos de verduras) a 250 para alimentos enlatados, exceto bebidas	Concentração de 50 para alimentos para bebês e alimentos à base de cereais transformados em enlatados destinados a lactantes e crianças jovens, com exceção dos produtos desidratados e em pó a 200 para gêneros alimentícios enlatados, com exceção de bebidas	Concentração de 50 em picanha, lombo e presunto a Concentração de 250 para alimentos enlatados (exceto bebidas)
Zn	Concentração de 5,00 para bebidas alcólicas fermentadas, fermento-destiladas, refrescos e refrigerantes a 50,00 para outros alimentos	---	---

1.3. Alimentos para consumo animal

A Instrução Normativa nº 15, de 26 de maio de 2009 do MAPA classifica os produtos para alimentação animal de acordo com a sua categoria, podendo ser: aditivo, alimento, concentrado, ingrediente, núcleo, premix, ração e suplemento, diferenciando-os entre si de acordo com a matéria prima utilizada e/ou objetivo nutricional (Brasil^h, 2009).

Estes alimentos devem fornecer aos animais os nutrientes necessários para manter o adequado crescimento e manutenção das suas funções biológicas. Os elementos químicos na alimentação animal podem ser classificados em macromelementos, que são elementos necessários em quantidades relativamente grandes, tais como Ca, Cl, K, Mg, Na, P e S, e em microelementos, que são elementos químicos necessários em quantidades menores, da ordem de miligramas ou microgramas por dia, tais como Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Se, Si, V e Zn (NRC^a, 1977; NRC^b, 1994; NRC^c, 2007; NRC^d, 2011; NRC^e, 2016).

Os elementos químicos auxiliam no crescimento dos ossos e dentes, na reparação de tecidos, regulam os processos químicos, ajudam em atividades musculares, liberam a energia para aquecer o corpo, auxiliam na síntese de proteínas, no transporte de oxigênio, equilíbrio ácido-base no corpo e reações enzimáticas, além de muitos outros benefícios (EUA^a, 2017). Na **Tabela 1.3** há a indicação de alguns elementos necessários para alguns animais.

Tabela 1.3. Elementos químicos necessários para alguns animais. Adaptada de (EUA^b, 2010).

Elemento/dia	Boi	Peixe (Truta)	Frango	Peixe	Cavalo
Ca (g)	87	0,051	3,75	0,051	47
P (g)	64	0,023	0,35	0,023	34
Mg (g)	24	0,003	0,055	0,003	17,8
S (g)	--	--	--	--	20,25
Na (g)	16	0,031	0,165	0,031	40,5
Cl (g)	--	0,046	--	0,046	--
K (g)	--	0,036	0,165	0,036	59
Cu (mg)	206,4	0,015	0,88	0,015	135
Fe (mg)	516	0,31	5,5	0,31	540
I (mg)	8,6	0,006	0,03	0,006	8,1
Co (mg)	1,892	--	--	--	1,4
Se (mg)	1,72	0,001	0,01	0,001	1,4
Mn (mg)	688	0,066	3,3	0,066	540
Zn (mg)	688	0,10	5,5	0,10	540

O MAPA é o órgão responsável por regulamentar e fiscalizar os alimentos destinados ao consumo animal através dos seus decretos, portarias e instruções normativas, as quais são aplicadas de acordo com o tipo de animal ao qual o alimento será destinado, sejam eles de produção para abate ou de estimação. Como exemplo, há a Instrução Normativa nº 04, de 01 de janeiro de 2007, que regulamenta as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e o roteiro de inspeção (Brasil^b, 2007); e a Instrução Normativa nº 13, de 01 de dezembro de 2004, que regulamenta os aditivos para produtos animais destinados à alimentação animal (Brasilⁱ, 2004).

A legislação brasileira ainda é escassa quanto aos elementos a serem regulados. O MAPA estabelece valores máximos e mínimos para elementos presentes em alimentos para animais de estimação (cães e gatos) e de abate (bovinos e equinos) (Brasilⁱ, 2004; Brasil^j, 2009). Entretanto, as instruções normativas N° 15/2009 e 30/2009 do MAPA não estabelecem limites para os elementos em alimentos para peixes, suínos e pequenos ruminantes, apenas que os fabricantes expressem no rótulo dos produtos os níveis de garantia máximos e mínimos para Ca e mínimos para os outros elementos (Brasil^k, 2009; Brasil^l, 2009), conforme **Tabela 1.4**.

Tabela 1.4. Níveis de garantia máximos e mínimos exigidos pelo MAPA para *pets* e *non-pets*, expressos em amostras comerciais para os elementos presentes em alimentos para animais de estimação e de abate.

Elemento	Cão	Gato	Peixe*	Bovino**	Caprino***	Pássaro*	Equino***
Ca (mínimo) / %	---	---	1,9	1:1 com P	12,0	0,6	14
Ca (máximo) / %	2,4	2,4	3,0	7:1 com P	19,0	0,8	22
P (mínimo) / %	0,6	0,6	1,4	40,0	7,5	0,3	7,5
Mg (mínimo) / %	---	---	0,20	5,0	1,2	---	1,3
Na (mínimo) / %	---	---	0,35	---	1,3	---	10,0
Co (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	0,2	30,0	95,0	---	50,0
Cu (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	17,0	400,0	350,0	2,8	1350,0
F (máximo) / mg kg ⁻¹	---	---	---	---	750,0	---	750,0
Fe (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	100,0	---	---	27,8	---

Tabela 1.4. (Continuação).

Elemento	Cão	Gato	Peixe*	Bovino**	Caprino***	Pássaro*	Equino***
I (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	0,3	30,0	60,0	0,56	50,0
Mn (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	23,0	500,0	1000,0	22,2	1400,0
S (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	2800,0	---	1400,0	---	5000,0
Se (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	0,2	5,0	20,0	0,08	10,0
Zn (mínimo) / mg kg ⁻¹	---	---	65,0	2000,0	5600,0	27,8	4000,0

* Níveis expressos em rações para a fase de terminação (Brasil^m, 2019). / **Suplemento mineral para animais em pastagem, expresso pelo MAPA (Brasil^l, 2009; Brasilⁿ, 2004). / ***Níveis expressos em amostras comerciais de suplementos (Brasil^o, 2019).

1.4. Métodos de preparo de amostra

A grande maioria das técnicas espectroanalíticas necessitam que a amostra esteja na forma líquida para introdução nos equipamentos, o que demanda estratégias analíticas para que as mesmas sejam completamente ou parcialmente dissolvidas em um meio líquido, que geralmente é um meio ácido (Krug, 2008).

A dissolução total da matriz possibilita a disponibilização completa dos analitos para análise, porém, em casos nos quais há o interesse em analitos que são facilmente extraídos da matriz estudada, pode ser utilizada a amostragem em suspensão. O preparo da amostra pode fornecer transformações substanciais nas formas químicas nas quais os analitos estão presentes em determinada matriz. Portanto, o procedimento a ser empregado estará relacionado com a natureza da amostra, concentração dos analitos e técnica analítica a ser empregada (Mester & Sturgeon, 2003; Mitra, 2003; Barnes et al., 2014).

1.4.1. Decomposição ácida em sistema fechado

A decomposição ácida em sistema fechado é o procedimento amplamente empregado para a solubilização total das amostras. Geralmente são empregados ácidos nítrico (HNO_3), clorídrico (HCl), fluorídrico (HF), perclórico (HClO_4) e sulfúrico (H_2SO_4) concentrados ou diluídos, com ou sem a adição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que atua como agente oxidante auxiliar (Krug, 2008; Barnes *et al.*, 2014).

Utilizando estes reagentes combinados ou não, o sistema fechado possibilita uma melhora na decomposição de amostras inorgânicas; minimiza os riscos de perdas de analito por volatilização e de contaminação por fontes externas; por causa das condições que podem ser obtidas neste tipo de

sistema, as reações ocorrem em curto tempo e acima das temperaturas de ebulição dos reagentes (Barnes *et al.*, 2014).

Na literatura, a decomposição de amostras de alimentos em sistema fechado usando misturas de HNO₃ e H₂O₂ são amplamente empregadas (Morgano *et al.*, 2011; Tormen *et al.*, 2011; da Silva *et al.*, 2013; Amorim *et al.*, 2016; de Souza *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2017; Amorim *et al.*, 2017; de Oliveira^a *et al.*, 2017; Costa^a *et al.*, 2018; Costa^b *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019). Também são aplicados o HNO₃ (Milani *et al.*, 2016) e mistura nitrosulfurosa (HNO₃ e HSO₄) (Morgano *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014). Para fornecer energia para a decomposição das amostras, são empregados bloco digestor com dedo frio (da Silva *et al.*, 2013; Amorim *et al.*, 2016; de Souza *et al.*, 2016), bloco digestor (Morgano *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014; Costa^a *et al.*, 2018) e em maior proporção, o forno micro-ondas (Tormen *et al.*, 2011; Milani *et al.*, 2016; Amorim *et al.*, 2017; Correia *et al.*, 2017; de Oliveira^a *et al.*, 2017; Costa^b *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019).

Em alimentos de consumo animal, a decomposição das amostras em sistema fechado emprega misturas de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (Neves *et al.*, 2009; Dionísio *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013), mistura de ácido nítrico e perclórico (Saleh *et al.*, 2013), mistura de ácidos nítrico e perclórico com peróxido de hidrogênio (de Moraes *et al.*, 2009), e ácido nítrico (Barros *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Psoma *et al.*, 2014), e na maior parte dos trabalhos relatados na literatura é amplamente empregado o forno micro-ondas (Neves *et al.*, 2009; Dionísio *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Saleh *et al.*, 2013; Psoma *et al.*, 2014). Como alternativa ao procedimento de digestão assistida por micro-ondas, há outros procedimentos, dentre eles, a extração assistida por ultrassom.

1.4.2. Extração assistida por ultrassom

Na extração assistida por ultrassom, a amostra é introduzida em um meio líquido, e através da ação das ondas ultrassônicas, as moléculas orgânicas presentes na amostra são destruídas e promovem a quebra da ligação do analito com as moléculas, fazendo com que os mesmos migrem da matriz para esse líquido, que é denominado extrator (Mester & Sturgeon, 2003; de Moraes *et al.*, 2009). Este tipo de procedimento tem uma aplicação crescente no preparo de amostras por causa da rapidez e simplicidade que oferece. Entretanto, deve ser dada uma atenção aos fatores que influenciam na extração, que são as características físicas da amostra, interação entre analito e amostra, concentração do agente extrator, tempo de sonicação, dentre outros (Mester & Sturgeon, 2003; Santos *et al.*, 2014).

A literatura reporta a extração assistida por ultrassom em amostras de alimentos utilizando HNO₃ (Dobrowolski *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014; de Andrade *et al.*, 2018), HCl (Silva *et al.*, 2012; de Andrade *et al.*, 2018), mistura de ácidos nítrico e clorídrico, e etanol (Costa^b *et al.*, 2018), mistura de ácidos nítrico e clorídrico (Amorim *et al.*, 2016; Amorim *et al.*, 2017), mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (de Andrade *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2018), mistura de ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio (Tai *et al.*, 2016).

Em alimento de consumo animal, a extração assistida por ultrassom tem sido realizada empregando ácido nítrico (de Moraes *et al.*, 2009), mistura de ácidos nítrico, clorídrico e acético (Barros *et al.*, 2013) e em maior proporção, o ácido clorídrico (Neves *et al.*, 2009; Saleh *et al.*, 2009; Saleh *et al.*, 2013; Saleh *et al.*, 2015). Estes procedimentos são utilizados no preparo das amostras para análise por uma ampla gama de técnicas espectrométricas atômicas.

1.5. Métodos baseados em plasma acoplado indutivamente

O plasma acoplado indutivamente (ICP) de argônio é um gás eletricamente neutro e altamente energizado composto por íons, elétrons e partículas neutras em movimento. O plasma é gerado por um campo magnético de radiofrequência, a alta frequência gerada faz com que os elétrons de argônio colidam com átomos de argônio, produzindo a ionização e ignição do plasma, esta transferência energética é chamada de acoplamento indutivo, sendo que a temperatura do plasma gerado pode chegar a 10.000 K. Em teoria, todos os elementos químicos da tabela periódica podem ser determinados através das técnicas baseadas em ICP, uma vez que metais, metaloides, não metais e óxidos refratários, ou seja, elementos químicos e compostos podem ser ionizados pela alta temperatura do plasma, porém, há restrições que dependem das propriedades espectrais e físicas dos elementos químicos (Montaser & Golightly, 1992; Ebdon *et al.*, 1998; Giné-Rosias, 1999).

Para espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), o plasma possui a função de gerar fótons de luz através da excitação dos átomos, elétrons e/ou íons. Por outro lado, na espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), o plasma é utilizado para gerar íons com cargas positivas ao invés de fótons (Ebdon *et al.*, 1998; Cubadda, 2007; Thomas, 2008).

Em ICP OES, a amostra, que é comumente introduzida sob a forma líquida, é nebulizada e forma um aerossol fino, o qual é transportado para o centro do plasma onde sofre os processos de dessolvatação, vaporização, dissociação, atomização, ionização, excitação, relaxação e emissão dos átomos e/ou íons (Ojeda & Rojas, 2007). Por outro lado, a introdução por ICP-MS, após a ionização, os analitos são enviados para um analisador de massas, o qual, com base na razão massa/carga (m/z) distingue os íons através da

aplicação de campos elétricos e magnéticos, permitindo que atinjam o detector (Cubadda, 2007; Thomas, 2008).

Os métodos baseados em ICP, principalmente ICP OES e ICP-MS, são amplamente empregados para a determinação da composição mineral em matrizes de alimentos, por possuírem capacidade multielementar, análises rápidas e limites de detecção da ordem de mg L^{-1} para ICP OES, podendo medir em $\mu\text{g L}^{-1}$, a depender do analito, e da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} para ICP-MS (Novaes *et al.*, 2016).

A técnica de ICP OES possui interferências espectrais, que ocorrem por causa da grande quantidade de linhas atômicas e iônicas, que são causadas pela formação de compostos moleculares; efeitos de ionização e efeitos termoquímicos associados à vaporização e atomização da amostra no plasma; e interferências não espectrais, que são causadas por variações de viscosidade e de tensão superficial proveniente das propriedades físicas da amostra (Montaser & Golightly, 1992).

Para ICP-MS, as interferências também são classificadas em espectrais e não espectrais. As interferências espectrais ocorrem quando há a presença de íons com razão m/z , devido à resolução utilizada. Este tipo de interferência é dividida em isobárica, causada por isótopos de diferentes elementos químicos que criam interferências com a mesma m/z do analito, e interferências moleculares ou poliatômicas, produzidas pela combinação de dois ou mais íons atômicos. Uma interferência não espectral clássica é a supressão de sinal causada pela própria matriz devido aos altos níveis de sólidos dissolvidos e/ou concentração de ácido. O sinal também é suprimido quando a matriz afeta as condições de ionização e quando há a perda de íons leves na região entre o cone extrator e as lentes iônicas, conhecido como efeito carga/espaco (Giné-Rosias, 1999; Thomas, 2008).

Ambas as técnicas baseadas em ICP (OES e MS) também podem ser empregadas como detector quando acopladas às técnicas de análise por

injeção em fluxo (FIA), para a determinação de elementos químicos com grande sensibilidade (Cerdà *et al.* 2018).

1.6. Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos e análise por injeção em fluxo multiseringa

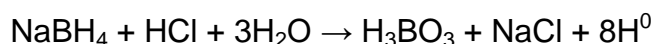
A espectrometria de fluorescência atômica (AFS) é uma técnica analítica que consiste na excitação eletrônica dos átomos para um nível de mais alta energia, em um tempo de 10^{-9} a 10^{-12} s e o elétron retorna ao seu estado energético inicial. Esta transição é provocada pela perda energética, que fornece a luz fluorescente utilizada como sinal analítico (Butcher, 2005; Ferreira *et al.*, 2019). A AFS possibilita limites de detecção da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , entretanto, a depender dos níveis de impurezas nas amostras, podem ocorrer espalhamento, supressão da fluorescência e emissão de sinal de fundo (Butcher, 2005; Albani, 2007).

A análise por injeção em fluxo multiseringa (MSFIA) é uma técnica que foi desenvolvida em 1999 por Cerdà e colaboradores, e que alia as características da FIA, trabalhar em paralelo, a robustez da análise por injeção sequencial (SIA) e a aplicação de válvulas solenóides como na análise por injeção em fluxo com multicomutação (MCFIA) (Cerdà *et al.*, 1999). Sistemas como a MSFIA acoplada à espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS) podem ser automatizados para reduzir consumo de reagentes e amostras.

A MSFIA consiste basicamente de uma bureta automática para mover simultaneamente quatro seringas, nas quais os pistões estão conectados à barra de transmissão. Quatro válvulas solenóides para direcionar o fluxo de reagente em cada seringa, possibilitando que os mesmos retornem para o reservatório quando não são utilizados, minimizando o gasto de reagente e

amostra, conforme será descrito mais detalhadamente no capítulo 4, seção 4.2.3. Dependendo do sistema MSFIA proposto, são adicionadas outras válvulas solenoides para direcionar o fluxo dos reagentes e amostra, se prosseguem para o sistema ou vão para o descarte. Podem ser adicionados vários tipos de detectores, tais como o AFS, ICP OES, ICP-MS, espectrometria de absorção atômica (AAS), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), dentre outros, a depender do objetivo da análise. Todos estes componentes estão conectados diretamente a um computador, o qual possui o software AutoAnalysis®, que possibilita a construção do programa para análise (Cerdà *et al.*, 1999; Cerdà *et al.*, 2018).

A HG é uma técnica baseada em basicamente três etapas, geração da espécie volátil, transporte da espécie volátil e atomização do hidreto. O agente redutor mais utilizado é o tetraidroborato de sódio (NaBH₄), com as seguintes reações no processo (Takase *et al.*, 2002; Kumar & Riyazuddin, 2010):



em que, X é o elemento químico gerador de hidretos, geralmente As, Bi, Ge, Hg, Pb, Sb, Se, Sn e Te (Takase *et al.*, 2002; Kumar & Riyazuddin, 2010).

As interferências em HG dependerão do tipo de sistema acoplado, das concentrações de ácido e agente redutor, e do tipo de atomizador utilizado; podendo ser obtidos limites de detecção da ordem de ng L⁻¹ (Kumar & Riyazuddin, 2010).

Atualmente, as técnicas de MSFIA e AFS têm sido acopladas à geração de hidretos (HG) e amplamente utilizadas para a determinação total e análise de especiação química em amostras ambientais e de alimentos (Serra, *et al.*, 2012; Portugal *et al.*, 2015; Castor *et al.*, 2016; de Santana *et al.*, 2016; Junior *et al.*, 2017).

1.7. Análise de especiação química

A concentração total de um elemento químico presente em uma matriz, não fornece informações definitivas a respeito da toxicidade ou não do mesmo, porque há fatores como a biodisponibilidade, bioacessibilidade, mobilidade e interação com os tecidos biológicos que influenciam nesta classificação. Para isto, torna-se necessária a realização da análise de especiação química, que de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC*) é o termo adequado a ser aplicado quando for feita referência à atividade analítica de identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma determinada matriz (Templeton *et al.*, 2000; Templeton & Fujishiro, 2017).

A realização da análise de especiação química depende de uma série de fatores que podem influenciar significativamente no resultado final obtido, tais como a etapa de amostragem, o preparo da amostra, tipo e concentração das espécies presentes na matriz, exatidão e precisão requeridas, e técnica analítica empregada. Todas estas etapas devem ser levadas em consideração para minimizar os riscos de perdas de analito por volatilização, degradação das espécies presentes na matriz, evitar a mudança de estados de oxidação, dentre outros, com o intuito de obter resultados analíticos confiáveis (Kiss *et al.*, 2017; Templeton & Fujishiro, 2017). Os fatores que podem afetar a análise de especiação química de um dado elemento químico têm sido avaliados com o auxílio da técnica de planejamento de experimentos.

1.8. Planejamento de experimentos

A técnica de planejamento de experimentos tem como objetivo melhorar processos em que a resposta desejada depende de duas ou mais variáveis, ou da interação entre as mesmas, e consiste em reconhecer o problema; avaliar a resposta; escolher os fatores e seu domínio experimental; escolher o planejamento experimental mais adequado; fazer uma avaliação preliminar dos fatores; aplicar a metodologia de superfície de resposta; realizar os experimentos; analisar os dados e avaliar os resultados obtidos (Neto, 2010; Ferreira, 2015).

Há alguns tipos de planejamento de experimentos aplicados à Química, tais como o fatorial completo de dois níveis e o fatorial fracionário, aplicados para a triagem das variáveis mais significativas para o sistema em estudo; e o fatorial completo de três níveis, composto central, Plackett-Burman, Box-Behnken e Doehlert, para a obtenção da metodologia de superfície de resposta, com o intuito de definir as condições críticas dos fatores avaliados (Novaes *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2018). Quando são obtidas muitas respostas em sistemas onde são aplicados os planejamentos, são mais comumente utilizadas as funções de resposta cromatográfica, desejabilidade e múltipla resposta (Bezerra *et al.*, 2019).

Os planejamentos experimentais simultâneos têm sido amplamente aplicados na otimização das condições de preparo das amostras e de sistemas analíticos, sendo mais vantajosos em relação aos procedimentos univariados por precisarem de uma quantidade menor de experimentos para obter as informações desejadas, além de possibilitar a avaliação das interações químicas que ocorrem entre as variáveis em estudo, e a obtenção de um menor consumo de amostras, reagentes e tempo (Ferreira *et al.*, 2018), sendo empregados em conjunto com as técnicas de planejamento de experimentos.

1.9. Análise multivariada de dados

As técnicas de reconhecimento de padrões são parte da análise multivariada de dados, consiste na aplicação das técnicas exploratórias, como análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), em amostras e variáveis do conjunto para extrair informações complementares não fornecidas pela análise univariada (Granato *et al.*, 2018).

A PCA consiste em transformar as variáveis originais em combinações lineares das mesmas, através da diagonalização da covariância ou matriz de correlação. As informações em n-dimensões são reduzidas de espaços dimensionais maiores para menores, geralmente para 2 ou 3 dimensões, sendo mais facilmente visualizadas através da representação gráfica, que se dá através dos valores de escores (*scores*) e pesos (*loadings*), sendo que os eixos onde os dados são projetados, são chamados de componentes principais (PC). Esta técnica possibilita a elaboração de hipóteses gerais baseadas na matriz de dados (Sharaf *et al.*, 1986; Ferreira^a, 2015).

A HCA baseia-se em um processo hierárquico, onde à medida que a matriz de dados é reduzida, as variáveis são agrupadas de acordo com as suas características através da distância inter-pontos. As similaridades entre as variáveis são representadas em um diagrama bi-dimensional chamado dendograma (Sharaf *et al.*, 1986; Lima *et al.*, 2010).

As técnicas de reconhecimento de padrões, PCA e HCA são complementares e possuem como finalidade observar tendências de similaridades ou diferenças entre as variáveis de um conjunto de dados, sendo amplamente empregadas em análise química (Ferreira^a, 2015; Souza *et al.*, 2017).

1.10. Objetivos

Esta tese de doutorado teve como objetivos gerais:

- ❖ Otimizar procedimentos de preparo de amostra para avaliação da composição mineral de rações animais utilizando métodos baseados em ICP, com o auxílio das técnicas de planejamento de experimentos e análise multivariada de dados;
- ❖ Determinar nutrientes em caldo de cana empregando amostragem em suspensão e detecção por ICP OES, após a otimização das condições de preparo das amostras por meio da aplicação de planejamento de experimentos;
- ❖ Realizar a análise de especiação química de As, Sb e Se inorgânicos em frutos secos através de um sistema MSFIA-HG-AFS, com as condições de decomposição das amostras e de geração de hidretos otimizadas por meio de planejamentos Doehlert.

Os objetivos específicos serão descritos em mais detalhes nos seus respectivos capítulos.

Capítulo 2. Otimização de procedimentos de preparo de amostra para avaliação da composição mineral de rações animais usando métodos baseados em ICP e análise multivariada de dados

2.1. Introdução

O mercado global para animais de estimação e de consumo tem crescido significativamente nos últimos anos e o monitoramento da composição mineral das rações destinadas aos mesmos é de grande importância porque contribuem significativamente com as funções corporais dos animais, além de ser relevante para a segurança dos alimentos (NRC^a, 1977; NRC^b, 1994; NRC^c, 2007; NRC^d, 2011; NRC^e, 2016; Sales & Janssens, 2003; Zuanon *et al.*, 2011).

Para auxiliar na determinação da composição mineral das rações animais, várias técnicas de planejamento de experimentos têm sido empregadas. Ávila *et al.* (2017) aplicaram um planejamento fatorial completo 2⁴ para encontrar as melhores condições para a decomposição das amostras de rações úmidas para cães e gatos e determinaram as concentrações de Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr, e Zn por ICP OES. Da Costa *et al.* (2013) aplicaram planejamentos fatoriais completos de dois e três níveis para otimizar as condições de digestão das amostras e dos parâmetros operacionais do espectrômetro, respectivamente, e obtiveram valores de concentrações para Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Ba, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Sr e Zn em rações secas para cães e gatos por ICP OES. Através de um planejamento fatorial de dois níveis, Oliveira *et al.* (2017) otimizaram os parâmetros operacionais de um sistema de pré-concentração usado para determinar Pb por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) em ração para frango.

Para avaliar tendências de similaridades ou diferenças entre as amostras, têm sido aplicadas as técnicas de PCA e HCA para reconhecimento de padrões. Costa^c *et al.* (2018) avaliaram amostras de rações secas para cães

e gatos e observaram que havia uma divisão das amostras de ração para cães em três grupos, o primeiro, formado por amostras contendo carne, frango e plantas em sua composição, o segundo contendo carne, e o terceiro contendo uma mistura. E para as rações para gatos, houve uma divisão em dois grupos, um formado por misturas e carnes, e o outro com misturas com peixes.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição mineral de rações destinadas a peixes ornamentais e de consumo humano, pássaros silvestres, coelhos, bovinos e equinos utilizando métodos baseados em plasma acoplado indutivamente (ICP OES e ICP-MS).

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar o processo de decomposição ácida assistida por micro-ondas de amostras de rações animais;
- Otimizar as condições operacionais do espectrômetro através de um planejamento Doehlert;
- Determinar os parâmetros de mérito dos métodos analíticos propostos através da análise de materiais de referência certificados;
- Aplicar os métodos otimizados em amostras de rações animais;
- Aplicar as técnicas de PCA e HCA para avaliar tendências nas amostras das rações de peixes, ruminantes, coelhos, pássaros silvestres e equinos.
- Avaliar as concentrações dos elementos químicos conforme normas vigentes de segurança de alimentos.

2.3. Procedimento Experimental

2.3.1. Instrumentação

As amostras de rações (peixes ornamentais, peixes de consumo humano, pássaros silvestres, coelhos, bovinos e equinos), foram homogeneizadas usando um moinho de bolas planetário (RETSCH, modelo PM 100, Düsseldorf, Alemanha) com o objetivo de que a granulometria fosse reduzida para menor do que 150 µm. As digestões das amostras de ração animal foram realizadas usando um forno micro-ondas (Milestone, modelo Ethos EZ, Sorisole, Itália).

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com vista axial (Varian, modelo View Pro, Mulgrave, Austrália) e um detector de estado sólido resfriado usando uma temperatura de – 5,0 °C (sistema *Peltier*) para as análises. O equipamento possui um policromador Echelle purgado com gás argônio a uma pureza de 99,9999% (White Martins, São Paulo, Brasil), que permite medidas na faixa espectral entre 167 e 785 nm. As condições utilizadas estão na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1. Condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica utilizado nas análises das amostras de rações animais.

Parâmetro	Condição
Potência de radiofrequência (kW)	1,2
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão de introdução da amostra (mL min ⁻¹)	0,8
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	1,0
Tipo de nebulizador	V-Groove
Câmara de nebulização	Sturman-Masters
Replicatas	3
Tempo de integração do sinal (s)	1,0
Comprimento de onda (nm)	Al (II) 167,019 B (I) 249,772 Ca (II) 317,933 Fe (II) 259,940 K (I) 769,897 Mg (II) 280,265 Mg (I) 285,213 Mg (II) 279,553 Mn (I) 257,610 Na (I) 588,995 P (I) 178,222 S (II) 181,972 Zn (I) 213,857

(I) Linha atômica / (II) Linha iônica.

Para a realização das análises das amostras de rações animais também foi empregado um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (Perkin Elmer, modelo ELAN 6000, Estados Unidos da América). Foram determinados os isótopos estáveis de ⁴⁵Sc, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu, ⁷²Ge, ⁷⁵As, ⁸²Se, ⁸⁸Sr, ¹⁰³Rh, ¹¹¹Cd, ¹²¹Sb, ¹³⁷Ba, ²⁰⁵Tl e ²⁰⁸Pb, sendo Sc, Ge, Rh

e Tl usados como padrões internos na concentração de 20 µg L⁻¹. As condições operacionais com o modo padrão do espectrômetro foram otimizadas utilizando uma solução padrão *tunning* de 10 µg L⁻¹ para Ba, Ce, Co, In, Li e U, permitindo a obtenção da intensidade máxima da razão massa / carga dos isótopos (⁷Li, ⁵⁹Co, ¹¹³In, ¹³⁷Ba e ²³⁸U), e observada a formação do óxido de cério (¹⁴⁰Ce¹⁶O⁺ / ¹⁴⁰Ce) abaixo de 1,5% e a dupla carga (¹⁴⁰Ce²⁺ / ¹⁴⁰Ce⁺) abaixo de 3,0%. O espectrômetro estava instalado no Laboratório de Espectrometria de Atômica e de Massa, Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, SC.

Foram empregados ao sistema de introdução de amostra uma câmara de nebulização ciclônica integrada com um nebulizador concêntrico, e um *skimmer* de níquel. A geração do plasma foi realizada utilizando argônio com pureza mínima de 99,998% (White Martins, São Paulo, Brasil), e foram aplicados 1,2 kW de potência de radiofrequência e uma vazão do gás de nebulização de 1,0 L min⁻¹. Para minimizar a possibilidade de interferências espectrais poliatômicas para os isótopos estáveis de ⁷⁵As e ⁸²Se, foram utilizadas as seguintes equações de correções: ⁷⁵As = -3,13220 * ⁷⁷ArCl⁺ e ⁸²Se = -1,00100 * ⁸³Kr.

2.3.2. Materiais, reagentes e soluções

Neste trabalho, todos os reagentes usados foram de grau analítico. As soluções de ácido nítrico 65% (m m⁻¹) e peróxido de hidrogênio 30% (m m⁻¹) foram de qualidade suprapura (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A água ultrapura para o preparo de todas as soluções foram obtidas a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos da América) com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹. As vidrarias utilizadas nos experimentos foram previamente descontaminadas em uma solução de ácido nítrico 10% (v v⁻¹) por 24h, sendo posteriormente lavadas com água

deionizada e mantidas a temperatura ambiente (Lopes *et al.*, 2009; Dantas *et al.*, 2013).

Para as análises por ICP OES foram preparadas soluções de calibração externa por diluição apropriada, de acordo com a faixa de trabalho, a partir de soluções estoque individuais de 1000 e 4000 mg L⁻¹ (Specsol®, São Paulo, Brasil) para Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S e Zn para a obtenção da faixa de trabalho com concentrações variando de 5,0 a 400 mg L⁻¹.

Para as análises por ICP-MS, uma solução estoque multielementar de 100 mg L⁻¹ contendo As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Se, Sr e V foi usada para preparar uma solução intermediária de concentração de 500 µg L⁻¹, que foi utilizada para preparar as soluções da curva de calibração na faixa de concentração de 0,25 a 50 µg L⁻¹.

2.3.3. Preparo das amostras de ração animal

Quarenta e duas amostras de rações de animais foram adquiridas em estabelecimentos comerciais das cidades de Salvador, Itabuna e Santo Estevão na Bahia, e Aracaju e Arauá em Sergipe. Destas, duas foram para coelho, treze para pássaros silvestres, cinco para equinos, quatro para ruminantes, quatorze para peixes ornamentais e quatro para peixes de consumo.

As rações para pássaros silvestres são indicadas para Agapornis (*Agapornis pullarius*), Arara (*Ara araraúna*, *Ara maçã*, *Ara chloroptera*), Azulão (*Cyanocopsa brissonii*), Bicudo (*Sporophila maximilianii*), Caboclinho (*Sporophila bouvreuil*), Calafate (*Lonchura (Padda) oryzivora*), Calopsita (*Nymphicus hollandicus*), Canário da Terra (*Sicalis flaveola*), Canário do Reino (*Serinus canaria*), Cardeal Vermelho (*Paroaria Coronata*), Coleiro (*Sporophila caerulescens*), Curió (*Sporophila angolensis*), Diamante de Gould (*Chloebia gouldiae*), Mandarin (*Poephila (Taeniopygia) guttata*), Papagaio (*Amazona*

aestiva), Pássaro Preto (*Gnorimopsar chopi*), Periquito Australiano (*Melopsittacus undulatus*), Sabiá (*Turdus rufiventris*) e Trinca-ferro (*Saltator similis*).

As rações para peixes ornamentais são indicadas para Acará Bandeira (*Pterophyllum scalare*), Acará Disco (*Symphysodon*), Barbo Sumatra (*Puntigrus tetrazona*), Beijador (*Helostoma temminckii*), Betta (*Betta splendens*), Carpa (*Cyprinus carpio*), Coridora (*Corydoras*), Cruzeiro do Sul (*Hemiodus gracilis*), Espada (*Xiphophorus hellerii*), Guppy (*Poecilia reticulata*), Kinguio (*Carassius auratus*), Labeo Bicolor (*Epalzeorhynchos bicolor*), Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*), Molinésia (*Poecilia latipinna*), Neon (*Paracheirodon*), Oscar Tigre (*Astronotus ocellatus*), Paulistinha (*Brachydanio rerio*), Platy (*Xiphophorus maculatus*), Ramirezzi (*Mikrogeophagus ramirezi*), Trichogaster lalius (*Colisa*), Tricogaster (*Tricogaster Leeri*) e Zebra Ciclídeo Africano (*Haplochromis Zebra Obliquidens*). E as rações para peixes de consumo são para: Curimatã (*Prochilodus lineatus*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e Tilápia (*Pseudocrenilabrinae*).

As amostras foram moídas manualmente em almofariz e pistilo para reduzir o tamanho da partícula e em seguida, moídas em um moinho de bolas planetário com ciclos de 10 min e 400 rotações por minuto (rpm), em recipientes de ágata, com uma mudança na direção da rotação a cada 10 s, para obtenção de granulometria menor do que 150 µm. Posteriormente, as amostras foram digeridas em um forno micro-ondas, após a otimização do procedimento através de um planejamento fatorial fracionário.

O procedimento otimizado consistiu de aproximadamente 0,1000 g de ração medida e transferida para tubos de politetrafluoroetileno (PTFE). Em seguida, foram adicionados os volumes de 700 µL de HNO₃ 65% (m m⁻¹), 1,65 mL de H₂O₂ 30% (m m⁻¹) e 7,65 mL de água ultrapura (para um volume final de 10 mL). Os tubos de PTFE foram submetidos a uma temperatura de 170 °C por 20 min sob uma potência de 400 W. Após o procedimento, as amostras foram

transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL e avolumadas com água ultrapura até um volume final de 15 mL.

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, incluindo as soluções branco e os materiais de referência. As análises por ICP OES foram realizadas diretamente nas amostras digeridas. Já para as análises por ICP-MS, as amostras foram diluídas usando um fator de 3:10.

2.3.4. Controle de qualidade

A exatidão e precisão dos métodos baseados em ICP foram avaliadas através das análises dos materiais de referência certificado (CRM) de tecido de ostra (Oyster tissue, NIST 1566b), adquirido do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, Gaithersburg, MD, EUA) e chá (Tea, NCS DC 73351) obtido do Centro Nacional de Análise de Ferro e Aço da China (Pequim, China).

2.3.5. Otimização das condições experimentais

Um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} foi aplicado para otimizar as condições de digestão no forno micro-ondas. As variáveis escolhidas para o planejamento foram: concentrações de HNO_3 e H_2O_2 , temperatura, tempo de digestão e potência de radiação do micro-ondas. A triplicata do ponto central para avaliar o erro experimental do planejamento.

Os dados experimentais foram processados usando o software Statistica® versão 6.0. A resposta para o planejamento foi avaliada utilizando o conceito de múltipla resposta (MR), obtida através das concentrações de Cu, Fe, Mg e Mn em uma amostra comercial de ração para peixes ornamentais. Apesar de serem determinados 23 elementos químicos, estes quatro foram escolhidos para avaliar a MR porque são elementos químicos que geralmente têm respostas individuais que convergem para uma mesma região comum do planejamento estudado, sem que as condições obtidas no planejamento afetem

os demais elementos químicos em estudo (Ferreira *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2019).

Para avaliar as condições operacionais do ICP OES, foi aplicado um planejamento Doehlert para duas variáveis: vazão do gás de nebulização (VGN: 0,6 – 1,0 L min⁻¹) e potência de radiofrequência (PRF: 1,0 – 1,4 kW), tendo como resposta a razão das intensidades das linhas do magnésio iônico e atômico [Mg II (280,265 nm) / Mg I (285,213 nm)] correspondendo a uma condição de robustez do plasma durante a introdução das soluções (Mermet, 1991).

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Otimização das condições de decomposição das rações animais

Um planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻² com triplicata do ponto central foi usado para identificar as melhores condições de decomposição das amostras secas de ração animal (Novaes *et al.*, 2016). A ração de peixe foi escolhida por apresentar o maior teor de gordura quando comparada com as demais rações. As variáveis avaliadas foram as concentrações de HNO₃ (1,0 – 4,0 mol L⁻¹) e H₂O₂ (1,0 – 5,0% m m⁻¹), temperatura (170 – 210 °C), tempo de digestão (10 – 20 min) e potência da radiação micro-ondas (400 – 800 W), conforma mostrado na **Tabela 2.2**.

Os experimentos foram realizados de forma aleatória. A triplicata do ponto central foi utilizada para estimar o erro experimental do planejamento fatorial. Uma massa seca de aproximadamente 0,1000 (±0,0001) g de uma amostra comercial de ração comercial para peixes ornamentais foi utilizada nos experimentos. Após a aplicação do planejamento, as concentrações de Cu, Fe, Mg e Mn foram obtidas para cada experimento do planejamento fatorial proposto e utilizadas para calcular a múltipla resposta (MR). Também poderiam

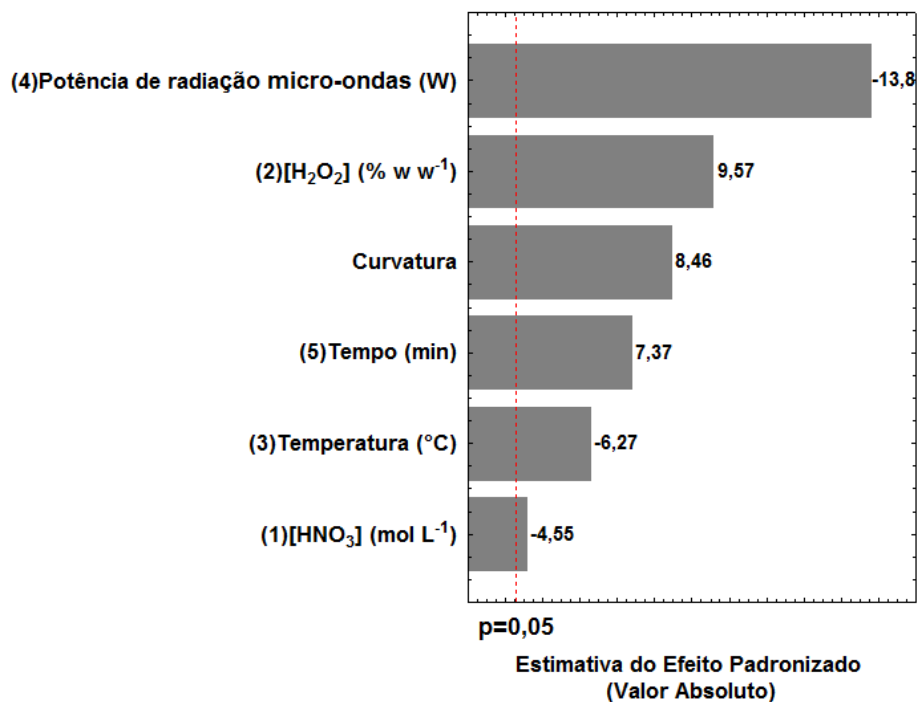
ser utilizadas as intensidades dos elementos químicos em estudo e a informação obtida seria igual. Estes dados subsequentemente foram usados para determinar as condições adequadas para uma decomposição eficiente e simultânea para todos os elementos. A MR foi calculada de acordo com a **Equação 2.1**.

$$MR = (\text{Conc. Cu} / \text{Máx. Conc. Cu}) + (\text{Conc. Fe} / \text{Máx. Conc. Fe}) + (\text{Conc. Mg} / \text{Máx. Conc. Mg}) + (\text{Conc. Mn} / \text{Máx. Conc. Mn}) \quad \text{Eq. 2.1.}$$

em que, “Conc. Cu” é a concentração de cobre encontrada em cada experimento e a “Máx. Conc. Cu” é a máxima concentração de cobre encontrada no planejamento fatorial. A mesma lógica se aplica para as concentrações de Fe, Mg e Mn.

Após a aplicação da análise simultânea das respostas, as variáveis e interações que causaram uma variação significativa na MR foram identificadas. A avaliação do planejamento fatorial fracionário proposto foi alcançada através de uma resolução III, um tipo de resolução que não confunde os efeitos principais, mas confunde os efeitos principais com os efeitos de interações entre dois fatores (Ferreira, 2015). O gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial está mostrado na **Figura 2.1**.

Figura 2.1. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} usado para avaliar as condições de digestão das amostras por radiação assistida por micro-ondas.



O gráfico de Pareto mostra os efeitos dos contrastes para as concentrações de HNO_3 e H_2O_2 , temperatura, potência de radiação das micro-ondas e tempo de digestão, usando a MR como resposta para os experimentos. A magnitude dos efeitos foi representada pelas colunas, com a linha vertical indicando a significância estatística a um nível de confiança de 95%, $p \geq 0,05$.

Tabela 2.2. Matriz do planejamento fatorial fracionário com triplicata do ponto central usada na avaliação das condições para a digestão da amostra de ração para peixe ornamental por radiação assistida por micro-ondas. (Valores codificados) / reais.

Experimentos	HNO ₃ (mol L ⁻¹)	H ₂ O ₂ % (m m ⁻¹)	Temperatura (°C)	Potência de radiação micro-ondas (W)	Tempo (min)	Múltipla resposta
1	(-1) / 1,0	(-1) / 1,0	(-1) / 170	(1) / 800	(1) / 20	3,61
2	(1) / 4,0	(-1) / 1,0	(-1) / 170	(-1) / 400	(-1) / 10	3,35
3	(-1) / 1,0	(1) / 5,0	(-1) / 170	(-1) / 400	(1) / 20	3,82
4	(1) / 4,0	(1) / 5,0	(-1) / 170	(1) / 800	(-1) / 10	3,32
5	(-1) / 1,0	(-1) / 1,0	(1) / 210	(1) / 800	(-1) / 10	2,64
6	(1) / 4,0	(-1) / 1,0	(1) / 210	(-1) / 400	(1) / 20	3,49
7	(-1) / 1,0	(1) / 5,0	(1) / 210	(-1) / 400	(-1) / 10	3,92
8	(1) / 4,0	(1) / 5,0	(1) / 210	(1) / 800	(1) / 20	3,25
9	(0) / 2,5	(0) / 3,0	(0) / 190	(0) / 600	(0) / 15	3,73
10	(0) / 2,5	(0) / 3,0	(0) / 190	(0) / 600	(0) / 15	3,64
11	(0) / 2,5	(0) / 3,0	(0) / 190	(0) / 600	(0) / 15	3,68

A **Figura 2.1.** mostra que os efeitos dos contrastes para a potência de radiação das micro-ondas, as concentrações de HNO₃ e H₂O₂, tempo e temperatura foram significativos para a digestão. Entretanto, a variável mais significativa foi a potência de radiação das micro-ondas, seguida pela concentração de H₂O₂, tempo de digestão, temperatura e concentração de HNO₃. Um aumento na MR foi observado quando concentração de HNO₃, potência de radiação das micro-ondas e tempo de digestão estavam em valores menores, e a concentração de H₂O₂ e a temperatura, estavam em valores maiores.

Em todos os experimentos, a eficiência na decomposição da amostra de ração para peixes ornamentais (composta de farelo, vesículas, carnes, cereais, etc.) foi aumentada usando HNO₃ diluído, no qual o poder oxidante é menor, porém, com a adição de H₂O₂, ocorre a regeneração do HNO₃ contribuindo para a manutenção da concentração ácida no sistema pressurizado e favorecendo a oxidação da matéria orgânica. Ou seja, uma maior concentração de H₂O₂ melhora a eficiência na decomposição da amostra mesmo com baixas concentrações de HNO₃ (Bizzi *et al.*, 2010). Esse procedimento está de acordo com os princípios da Química verde porque reduz a concentração final da solução (Gałuszka *et al.*, 2013).

O teste de curvatura foi aplicado para as respostas obtidas no planejamento fatorial fracionário proposto. Este teste foi calculado usando a seguinte expressão: $curvatura = MR_{Exp} - MR_{PC}$, onde MR_{Exp} é a média das respostas dos oito experimentos especificados, e MR_{PC} é a média das respostas obtidas para a triplicata do ponto central. Analisando os resultados, $MR_{Exp} = (3,43 \pm 0,33)$ e $MR_{PC} = (3,68 \pm 0,11)$, sugerem que as duas médias não são estatisticamente diferentes, com valor de curvatura igual a zero (0,0). Desta maneira, não foi possível observar condição de máximo ou de mínimo na região central dos domínios experimentais dos fatores estudados (Ferreira, 2015).

Após a análise simultânea dos dados, foi possível estabelecer o procedimento de digestão do experimento 3 como uma condição ótima, onde as variáveis nesse experimento são utilizadas nos níveis indicados pelo gráfico de Pareto e a MR (3,82) não é estatisticamente diferente da maior resposta obtida, experimento 7, onde a MR foi de 3,92. Assim, nos experimentos subsequentes foram utilizadas as seguintes condições: 1,0 mol L⁻¹ de HNO₃, 5,0% m m⁻¹ de H₂O₂, 170 °C de temperatura, 20 min de tempo de digestão e 400 W de potência de radiação das micro-ondas, para um volume reacional de 10 mL e 0,1000 g de amostra de ração para peixe ornamental. Esta condição escolhida apresentou uma acidez residual de aproximadamente 1,0 mol L⁻¹.

2.4.2. Avaliação das condições operacionais do ICP OES através de um planejamento Doehlert

A avaliação da robustez do plasma, foi realizada usando as condições experimentais da potência de radiofrequência (PRF) e vazão do gás de nebulização (VGN) através de um planejamento Doehlert, como mostrado na **Tabela 2.3**. A resposta para o planejamento proposto foi avaliada através da razão entre as intensidades de emissão das linhas do magnésio (Mg II [280,265 nm] e Mg I [285,213 nm]), onde uma razão ≥ 8 indica uma condição de robustez, apropriada para a introdução de uma solução no plasma, que não perde a eficiência de energia (Silva *et al.*, 2012; Dennaud *et al.*, 2001).

O planejamento foi aplicado para uma solução digerida de uma amostra comercial de ração para peixes ornamentais e para uma solução padrão multielementar com concentração de 5,0 mg L⁻¹ em um meio de HNO₃ a 1,0 mol L⁻¹, esta solução foi utilizada para simular a matriz. A avaliação simultânea das respostas encontradas para as razões entre as linhas de emissão do magnésio, obtidas a partir das intensidades para as duas soluções, foi através do conceito de MR calculado de acordo com a **Equação 2.2**.

$$MR = [(Mg\ II / Mg\ I) / (Mg\ II / Mg\ I)_{max}]_{digerida} + [(Mg\ II / Mg\ I) / (Mg\ II / Mg\ I)_{max}]_{solução\ padrão}$$

Eq. 2.2.

em que, (Mg II / Mg I) é o valor da relação entre as intensidades das linhas de emissão [Mg II 280,265 nm e Mg I 285,208 nm] e (Mg II / Mg I)_{max} é o valor máximo da relação entre as intensidades das linhas de emissão do magnésio para a digestão da amostra comercial de ração para peixes ornamentais (7,30) e a solução multielementar (7,76).

Tabela 2.3. Matriz do planejamento Doehlert para otimização das condições operacionais do espectrômetro.

Experimentos	Valor codificado / Valor real		Respostas		
	VGN (L min ⁻¹)	PRF (kW)	^a Razão (Mg II / Mg I)	^b Razão (Mg II/Mg I)	^c Múltipla resposta
1	(+1) / 1,0	(0) / 1,2	7,13	7,72	1,97
2	(+0,5) / 0,9	(+0,866) / 1,4	7,30	7,76	2,00
3	(-1) / 0,6	(0) / 1,2	3,64	3,47	0,95
4	(-0,5) / 0,7	(-0,866) / 1,0	3,01	2,96	0,79
5	(+0,5) / 0,9	(-0,866) / 1,0	5,94	6,27	1,62
6	(-0,5) / 0,7	(+0,866) / 1,4	5,22	5,03	1,36
7	(0) / 0,8	(0) / 1,2	5,90	6,05	1,59
8	(0) / 0,8	(0) / 1,2	5,89	6,02	1,58
9	(0) / 0,8	(0) / 1,2	5,94	6,02	1,59

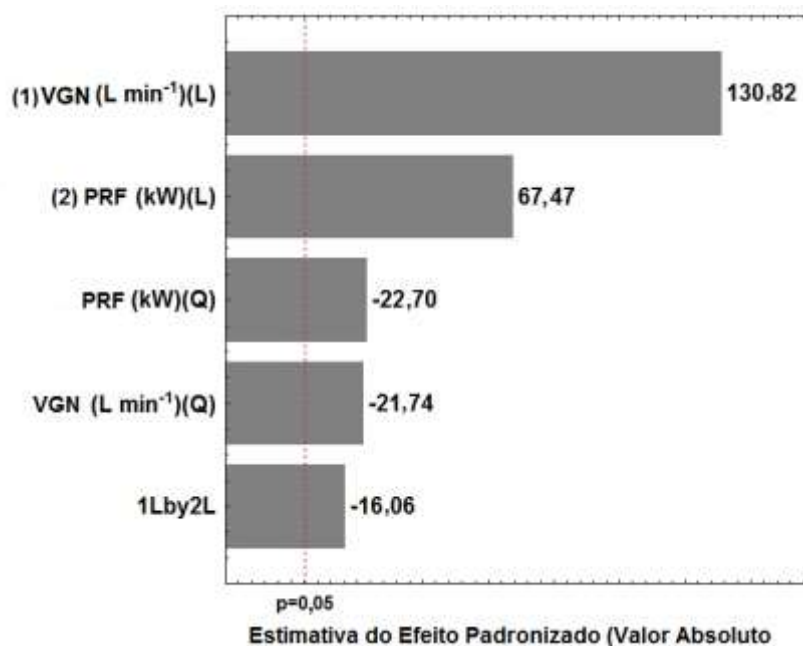
Razão (Mg II / Mg I) obtida através: (a) amostra comercial de ração para peixes ornamentais ; (b) solução multielementar em meio ácido e (c) Multipla resposta. Razão Mg II / Mg I, onde Mg II é a intensidade de emissão da linha iônica a 280,276 nm e Mg I é a intensidade de emissão da linha atômica a 285,213 nm x 1,8 (Dennaud *et al.*, 2001).

Após a análise do planejamento Doehlert proposto, o gráfico de Pareto foi gerado para avaliar quais variáveis foram significativas para o sistema, conforme **Figura 2.2**. Os efeitos das condições avaliadas para PRF e VGN foram significativos para ambos, as variáveis linear e quadrática, e a interação linear.

As variáveis mais significativas foram VGN e PRF, ambas para valores de máximo, ou seja, quando estas variáveis estão em níveis mais altos, a MR

obtida é maximizada. As variáveis quadráticas e a interação linear entre PRF e VGN foram significativas para valores de mínimo.

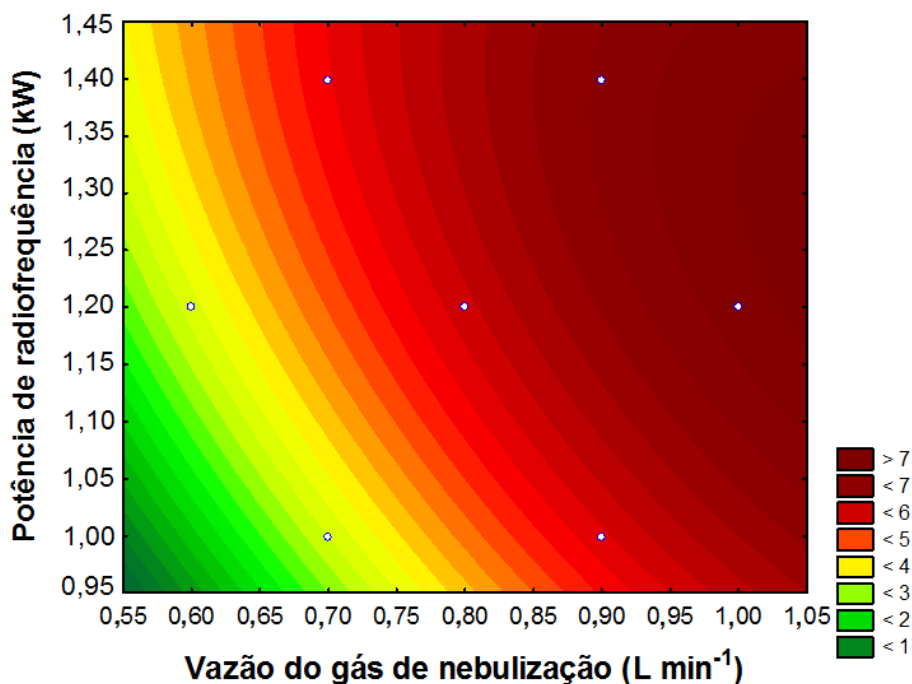
Figura 2.2. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento Doehlert usado para avaliar as condições operacionais do espectrômetro, sendo utilizada a MR para avaliação.



O gráfico de contorno, **Figura 2.3**, mostrou que aumentando a VGN e a PRF para níveis de máximo, a resposta obtida se aproxima da região ótima do experimento. A melhor resposta apresentada para o experimento nas três situações foi o experimento 2, onde a PRF e a VGN são 1,4 kW e 0,9 L min⁻¹, respectivamente, com um valor de razão (Mg II / Mg I) de 7,30 para a amostra digerida, 7,76 para a solução multielementar em HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ e 2,00 para a múltipla resposta. Os valores de razão Mg II / Mg I foram menores do que 8,0, não sendo considerado um plasma sob condição de robustez. Entretanto, como as análises foram realizadas utilizando um nebulizador pneumático V-Groove e uma câmara de nebulização Sturman-Masters, já era esperado que os experimentos obtivessem um valor de razão $\leq 8,0$ (Trevizan *et al.*, 2005; Sharp^a, 1988; Sharp^b, 1988).

O nebulizador V-Groove possui alta tolerância a sólidos dissolvidos (25% m v^{-1}). Entretanto, seu formato não é adequado para a geração de um aerossol homogêneo, produzindo partículas de tamanho irregular, com baixa eficiência. Portanto, para minimizar essa desvantagem, é recomendado um aumento na taxa de fluxo da amostra. A câmara *Sturman-Masters* permite que partículas maiores possam ser transportadas, formando gotas maiores do aerossol, afetando o processo de dessolvatação e as linhas de emissão dos analitos, resultando em uma menor intensidade e afetando a sensibilidade (Trevizan *et al.*, 2005; Sharp 1988^a, Sharp 1988^b).

Figura 2.3. Gráfico de contorno obtido entre a potência de radiofrequência e a vazão do gás de nebulização para o planejamento Doehlert para a amostra comercial de ração para peixes ornamentais.



Após a análise dos dados, os valores críticos obtidos para as três situações foram de aproximadamente 1,2 kW de PRF e 1,2 L min^{-1} , conforme **Tabela 2.4**. Entretanto, os valores de VGN estavam fora do domínio experimental proposto. Porém, após a inspeção visual do gráfico de contorno foi possível verificar que uma PRF de 1,2 kW e uma VGN de 1,0 L min^{-1} estava

com uma condição ótima, correspondendo ao experimento 1. Neste experimento, as razões Mg II / Mg I obtidas foram 7,13 para a amostra digerida e de 7,72 para a solução multielementar em HNO₃ 1,0 mol L⁻¹, com um valor de 1,97 para a MR, a segunda maior condição de robustez.

Tabela 2.4. Valores críticos obtidos para o planejamento Doehlert nas três situações (amostra de ração comercial, solução multielementar e múltipla resposta).

Amostra de ração para peixes ornamentais			
Fator	Mínimo	Valores críticos	Máximo
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,6	1,2	1,0
Potência de radiofrequência (W)	1000	1225	1400
Solução aquosa multielementar			
Fator	Mínimo	Valores críticos	Máximo
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,6	1,3	1,0
Potência de radiofrequência (W)	1000	1222	1400
Múltipla resposta			
Fator	Mínimo	Valores críticos	Máximo
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,6	1,2	1,0
Potência de radiofrequência (W)	1000	1219	1400

A validação do modelo quadrático obtido foi avaliada através do método de regressão linear entre os valores preditos e os valores observados. A equação obtida foi $y = (0,9766 \pm 0,0567)x + (0,1298 \pm 0,3241)$ e o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9942. Como o coeficiente angular inclui o valor unitário ($0,9199 < 1,0000 < 1,0333$) e o coeficiente linear inclui o valor zero ($-0,1943 < 0,0000 < 0,4539$), pode-se concluir que os valores experimentais e

preditos, para os coeficientes angular e linear, estavam em concordância com a faixa de condição ideal para a análise de regressão linear ($a = 1$ e $b = 0$). O coeficiente de correlação (0,9942) foi maior do que 0,99; um coeficiente de correlação forte para os valores preditos e experimentais (Nechar *et al.*, 1999; Ferreira, 2015).

2.4.3. Validação dos métodos propostos baseados em ICP para análise de rações animais

Para o método de ICP OES, os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) foram calculados usando a concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) e a razão sinal / ruído (SBR), de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), conformes **Equações 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6.**

$$\text{SBR} = (I_{\text{padrão}} - I_{\text{branco}}) / I_{\text{branco}} \quad \text{Eq. 2.3.}$$

$$\text{BEC} = C_{\text{padrão}} / \text{SBR} \quad \text{Eq. 2.4.}$$

em que, $I_{\text{padrão}}$ e I_{branco} são as intensidades de emissão para o elemento de referência e a solução branco, respectivamente, no comprimento de onda selecionado, e $C_{\text{padrão}}$ é a concentração do elemento de referência na solução (IUPAC, 1978).

$$\text{LoD} = (3 \times \text{RSD}_{\text{branco}} \times \text{BEC}) / 100 \quad \text{Eq. 2.5.}$$

$$\text{LoQ} = (10 \times \text{RSD}_{\text{branco}} \times \text{BEC}) / 100 \quad \text{Eq. 2.6.}$$

em que, $\text{RSD}_{\text{branco}}$ é o desvio padrão relativo da intensidade de emissão das medidas de 10 soluções branco no comprimento de onda selecionado (IUPAC, 1978; Schiavo *et al.*, 2009).

A **Tabela 2.5.** mostra os valores obtidos para SBR, BEC, LoD e LoQ para análise das amostras de rações animais por ICP OES variando entre 0,2 e

23 mg kg⁻¹ para LoD e entre 0,7 e 76 mg kg⁻¹ para LoQ, para os elementos Mn e Al, respectivamente.

Tabela 2.5. Parâmetros obtidos para as técnicas de ICP OES e ICP-MS nas análises de rações animais.

Técnica	Parâmetros	SBR	BEC	LoD (mg kg ⁻¹) ^a	LoQ (mg kg ⁻¹) ^a
ICP OES	Al	59	0,24	23	76
	B	0,007	0,022	1,0	3,3
	Ca	0,11	0,38	17	57
	Fe	0,035	0,18	5,3	18
	K	0,079	0,26	12	40
	Mg	0,017	0,058	2,6	8,7
	Mn	0,001	0,004	0,2	0,7
	Na	232	0,045	16	53
	P	0,070	0,23	11	37
	S	0,096	0,32	15	50
	Zn	0,008	0,026	1,2	4,6
ICP-MS	As	n.d.	n.d.	0,01	0,03
	Ba	n.d.	n.d.	0,05	0,2
	Cd	n.d.	n.d.	0,005	0,02
	Co	n.d.	n.d.	0,008	0,03
	Cr	n.d.	n.d.	0,2	0,7
	Cu	n.d.	n.d.	0,06	0,2
	Ni	n.d.	n.d.	0,04	0,1
	Pb	n.d.	n.d.	0,01	0,03
	Sb	n.d.	n.d.	0,01	0,03
	Se	n.d.	n.d.	0,02	0,07
	Sr	n.d.	n.d.	0,1	0,3
	V	n.d.	n.d.	0,008	0,03

n.d. = não determinado / ^aValores calculados para um volume de 15 mL e 0,1000 g de massa.

Para as análises por ICP-MS, os LoD e LoQ foram calculados de acordo com as **Equações 2.7. e 2.8.**

$$\text{LoD} = (3 \times \text{SD}) / s \quad \text{Eq. 2.7.}$$

$$\text{LoQ} = (10 \times \text{SD}) / s \quad \text{Eq. 2.8.}$$

em que, SD é o desvio padrão das medidas de 10 soluções branco e *s* é a inclinação da curva de calibração para cada elemento (IUPAC, 1978). Os valores de LoD variaram de 0,005 mg kg⁻¹ (Cd) a 0,02 mg kg⁻¹ (Cr), e de LoQ variaram de 0,02 mg kg⁻¹ (Cd) a 0,7 mg kg⁻¹ (Cr), conforme **Tabela 2.5.** Os valores obtidos foram concordantes com os reportados na literatura para matrizes semelhantes, conforme **Tabela 2.6.**

A exatidão dos métodos propostos baseados em plasma indutivamente acoplado foi avaliada através da análise de materiais de referência certificados (CRM), tecido de ostra (Oyster tissue, NIST 1566b) e chá (Tea, NCS DC 73351). A concordância entre os valores certificados e os valores encontrados variaram de 80 ± 7% (B) a 120 ± 9% (Se). A precisão, expressa através do desvio padrão relativo (RSD%, n=3), foi menor do que 10%. Assim, os métodos propostos foram considerados exatos e precisos para a determinação de macroelementos (Al, Ca, Fe, K, Na, Mg, P e S), microelementos (B, Cu, Mn e Zn) e elementos traço (As, Ba, Cd, Co, Cr, Ni, Sb, Se, Sr, Pb e V) presentes em amostras de ração animal, como mostrado na **Tabela 2.7.**

Tabela 2.6. Limites de detecção relatados na literatura em matrizes semelhantes.

Elemento	LoD neste trabalho (mg kg ⁻¹)	LoD (mg kg ⁻¹)	Matriz	Técnica	Referência
As	0,01	0,52 / 5,2 x 10 ⁻³	Rações para peixes e peixes de consumo humano	SIMAAS / GF AAS	Psoma <i>et al.</i> (2014)
Cd	5,0 x 10 ⁻³	6,4 x 10 ⁻³ / 2,4 x 10 ⁻³			
Cu	0,06	0,102 / 0,056			
Pb	0,01	0,08 / 0,03			
As	0,01	1,0 x 10 ⁻⁴ / 5,0 x 10 ⁻⁵	Peixes de consumo humano	GF AAS / HR-CS-GF AAS	Zmozinski <i>et al.</i> (2015)
As	0,01	2,0 x 10 ⁻³	Peixes de consumo humano	ICP OES	Silva <i>et al.</i> (2017)
Cd	5,0 x 10 ⁻³	1,1 x 10 ⁻⁴			
Pb	0,01	1,9 x 10 ⁻³			
Cu	0,06	0,11 / 0,085 / 0,63	Rações para boi, cavalo e ave	MP-AES / ICP OES / FAAS	Li <i>et al.</i> (2013) ¹
Fe	5,3	0,20 / 0,090 / 1,27			
Mn	0,2	0,075 / 0,27 / 1,18			
Zn	1,2	0,11 / 0,090 / 2,07			
Pb	0,01	0,28	Ração para frangos	FAAS	Oliveira <i>et al.</i> (2017) ²
As	0,01	0,055		GF AAS	Dionísio <i>et al.</i> (2011)

¹Calculados com base em 1 g de massa de amostra e 50 mL de volume final / ²Calculado com base em 0,12 g de massa de amostra e 20 mL de volume final. SIMAAS: espectrometria de absorção atômica simultânea / GF AAS: espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite / HR-CS-GF AAS: espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e atomização em forno de grafite / ICP OES: espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente / MP-AES: espectrometria de emissão atômica com plasma de micro-ondas / FAAS: espectrometria de absorção atômica com chama.

Tabela 2.7. Resultados obtidos para as análises dos materiais de referência certificados por ICP OES e ICP-MS.

CRM NIST 1566b				CRM NCS DC 73351				
Elemento	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância (%)	RSD (%)	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância (%)	RSD (%)
ICP OES								
Al (mg kg ⁻¹)	197,2 ± 6,0	220,9 ± 31,1	112 ± 14	5,7	0,30 ^a	0,26 ± 0,01	87 ± 2	0,7
B (mg kg ⁻¹)	4,5 ± 1,9	<3,3	n.d.	n.d.	15 ± 4	12 ± 1	80 ± 7	3,4
Ca (%)	0,0838 ± 0,0020	0,0876 ± 0,0051	104 ± 6	2,3	0,43 ± 0,04	0,43 ± 0,02	100 ± 4	1,7
Fe (mg kg ⁻¹)	205,8 ± 6,8	175,6 ± 11,9	85 ± 6	2,7	264 ± 15	218 ± 49	83 ± 19	9,1
K (%)	0,652 ± 0,009	0,560 ± 0,009	86 ± 1	0,7	1,66 ± 0,12	1,41 ± 0,05	85 ± 3	1,3
Mg (%)	0,1085 ± 0,0023	0,1139 ± 0,0011	105 ± 1	0,4	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01	107 ± 4	1,4
Mn (mg kg ⁻¹)	18,5 ± 0,2	14,7 ± 1,2	81 ± 3	1,3	1240 ± 70	1236 ± 31	99 ± 2	1,0
Na (%)	0,3297 ± 0,0053	0,3296 ± 0,0443	100 ± 13	5,4	44 ± 6	<53	n.d.	n.d.
P (%)	n.i.	0,885 ± 0,149	n.d.	6,8	2840 ± 90	2385 ± 100	84 ± 4	1,7
S (%)	0,689 ± 0,014	0,662 ± 0,003	99 ± 14	5,7	0,245 ± 0,022	0,223 ± 0,006	91 ± 2	1,1
Zn (mg kg ⁻¹)	1424 ± 46	1394 ± 99	102 ± 14	5,7	26,3 ± 2,0	29,3 ± 2,9	111 ± 11	4,0
ICP-MS								
As (mg kg ⁻¹)	7,65 ± 0,65	8,54 ± 0,68	112 ± 9	3,2	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,03	105 ± 9	3,7
Ba (mg kg ⁻¹)	8,6 ± 0,3	7,7 ± 0,2	90 ± 3	1,3	58 ± 6	64 ± 3	110 ± 5	2,1
Cd (mg kg ⁻¹)	2,48 ± 0,08	2,19 ± 0,22	88 ± 9	4,1	0,057 ± 0,010	0,056 ± 0,001	98 ± 2	0,8
Co (mg kg ⁻¹)	0,371 ± 0,009	0,333 ± 0,043	90 ± 12	5,3	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03	108 ± 14	5,3
Cr (mg kg ⁻¹)	n.i.	0,950 ± 0,142	n.d.	6,0	0,80 ± 0,03	0,83 ± 0,20	104 ± 25	10
Cu (mg kg ⁻¹)	71,6 ± 1,6	59,1 ± 5,4	83 ± 8	3,7	17,3 ± 1,8	15,8 ± 3,9	91 ± 22	9,9
Ni (mg kg ⁻¹)	1,04 ± 0,09	0,89 ± 0,27	86 ± 4	1,7	4,6 ± 0,5	4,8 ± 0,4	103 ± 9	3,6
Pb (mg kg ⁻¹)	0,308 ± 0,009	0,298 ± 0,086	103 ± 12	4,7	4,4 ± 0,03	4,4 ± 0,2	100 ± 5	3,4

Tabela 2.7. (Continuação).

CRM NIST 1566b					CRM NCS DC 73351			
Elemento	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância (%)	RSD (%)	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância (%)	RSD (%)
Sb (mg kg ⁻¹)	0,011 ± 0,002	<0,03	n.d.	n.d.	0,056 ± 0,006	0,063 ± 0,001	112 ± 2	0,7
Se (mg kg ⁻¹)	2,06 ± 0,15	2,46 ± 0,19	120 ± 9	3,0	0,072 ^a	<0,07	n.d.	n.d.
Sr (mg kg ⁻¹)	6,8 ± 0,2	7,0 ± 0,3	103 ± 5	1,9	15,2 ± 0,7	12,2 ± 1,6	81 ± 11	10
V (mg kg ⁻¹)	0,577 ± 0,023	0,475 ± 0,044	82 ± 8	3,8	0,86 ^a	<0,03	n.d.	n.d.

Todos os resultados foram expressos como média ± intervalo de confiança a 95% (n=3).

n.i. = não informado.

n.d. = não determinado.

^aValor informado no certificado CRM.

2.4.4. Aplicação dos métodos analíticos em amostras de ração animal

Os métodos analíticos otimizados foram aplicados na análise de amostras de ração: 02 para coelhos, 13 para pássaros silvestres, 05 para equinos, 04 para ruminantes, 14 para peixes ornamentais e 04 para peixes de consumo humano. Foram coletadas poucas amostras de rações para ruminantes, equinos e peixes de consumo por causa da dificuldade de encontrar amostras de marcas diferentes, além de geralmente serem vendidas em sacos de 50 kg. Nestas amostras, foram determinadas as concentrações dos macroelementos (Al, Ca, Fe, K, Na, Mg, P e S), microelementos (B, Ba, Cu, Mn, Sr e Zn) e elementos traço (As, Cd, Co, Cr, Ni, Sb, Se, Pb e V) empregando as técnicas de ICP OES e ICP-MS. Os resultados obtidos estão expressos nas **Tabelas 2.8 e 2.9**. Entretanto, para melhor visualização dos dados, foram realizados resumos estatísticos para cada tipo de ração animal, conforme **Tabelas 2.10 a 2.14**, bem como gráficos com as concentrações médias dos elementos em cada tipo de ração animal, como mostra as **Figuras 2.4 a 2.6**.

Tabela 2.8. Resultados obtidos para as concentrações encontradas em ração animal utilizando ICP OES.

Amostra	Al (%)	B (mg kg ⁻¹)	Ca (%)	Fe (mg kg ⁻¹)	K (%)	Mn (mg kg ⁻¹)	Mg (%)	Na (%)	P (%)	S (%)	Zn (mg kg ⁻¹)
PO1	0,049±0,003	6,24±1,64	1,28±0,14	252±22	0,982±0,009	19±1,0	0,197±0,016	0,170±0,030	1,01±0,11	0,320±0,040	103±11
PO2	0,140±0,033	<3,3	3,37±0,36	954±73	1,82±0,32	20±1,3	0,262±0,052	1,15±0,11	2,79±0,38	0,890±0,200	120±23
PO3	0,267±0,035	18±4,5	1,77±0,43	884±216	1,63±0,33	141±19	0,285±0,060	0,899±0,092	1,42±0,22	0,609±0,142	145±33
PO4	0,062±0,006	20±2,5	0,532±0,088	402±34	1,37±0,28	79±11	0,247±0,033	0,692±0,153	0,788±0,015	0,519±0,099	147±6,9
PO5	0,057±0,002	<3,3	1,28±0,10	332±21	0,628±0,062	90±34	0,147±0,016	0,227±0,045	1,05±0,09	0,313±0,036	138±13
PO6	0,316±0,005	18±4,0	2,16±0,20	847±53	1,17±0,12	180±19	0,287±0,009	0,673±0,005	1,67±0,01	0,506±0,056	185±22
PO7	0,086±0,015	6,3±1,7	2,92±0,18	338±91	1,00±0,04	64±16	0,217±0,005	0,213±0,003	1,91±0,20	0,441±0,024	171±4,6
PO8	0,040±0,009	<3,3	1,51±0,22	251±28	0,839±0,113	20±5,0	0,177±0,022	0,219±0,040	1,18±0,22	0,299±0,049	49±6,1
PO9	0,098±0,018	<3,3	1,36±0,15	557±81	1,01±0,14	136±43	0,233±0,027	0,350±0,040	1,12±0,13	0,546±0,085	170±25
PO10	0,341±0,012	<3,3	0,509±0,039	824±80	1,07±0,06	171±25	0,258±0,020	0,588±0,054	0,591±0,016	0,445±0,024	173±9,0
PO11	0,055±0,004	<3,3	2,64±0,58	447±23	0,689±0,156	67±16	0,176±0,034	0,330±0,082	1,93±0,38	0,424±0,094	235±50
PO12	0,029±0,003	<3,3	1,79±0,08	482±19	0,852±0,023	65±13	0,199±0,016	0,639±0,030	1,46±0,06	0,474±0,058	296±9,4

Tabela 2.8. (Continuação).

Amostra	Al (%)	B (mg kg ⁻¹)	Ca (%)	Fe (mg kg ⁻¹)	K (%)	Mn (mg kg ⁻¹)	Mg (%)	Na (%)	P (%)	S (%)	Zn (mg kg ⁻¹)
PO13	0,224±0,003	<3,3	1,17±0,06	582±25	1,02±0,05	147±5,2	0,221±0,009	0,627±0,021	1,03±0,05	0,420±0,033	155±8,8
PO14	0,014±0,001	<3,3	0,162±0,014	136±14	1,00±0,02	15±0,7	0,183±0,005	0,679±0,027	0,355±0,020	0,177±0,003	31±1,3
PC1	<76 ^a	<3,3	0,800±0,107	<18	0,691±0,077	19±3,4	0,160±0,018	0,481±0,040	1,01±0,10	0,415±0,052	50±6,0
PC2	<76 ^a	<3,3	1,61±0,20	137±32	0,681±0,066	17±1,9	0,155±0,012	0,667±0,048	1,39±0,05	0,450±0,024	49±4,3
PC3	0,036±0,002	<3,3	2,00±0,05	542±27	0,874±0,043	65±3,5	0,201±0,005	0,643±0,025	1,66±0,08	0,573±0,016	316±9,2
PC4	0,011±0,001	<3,3	0,787±0,195	128±18	0,876±0,072	84±10	0,300±0,009	0,033±0,004	1,38±0,23	0,134±0,022	71±10
CO1	0,121±0,031	15±0,6	1,88±0,15	1457±206	1,05±0,07	130±10	0,368±0,022	0,223±0,037	0,923±0,074	0,172±0,013	72±4,2
CO2	0,124±0,027	14±1,2	2,00±0,05	1146±139	1,02±0,05	111±7	0,350±0,018	0,071±0,002	0,807±0,062	0,152±0,001	64±3,1
PS1	0,004±0,001	7,53±1,11	0,656±0,025	110±9,3	0,590±0,026	22,4±4,4	0,084±0,005	0,066±0,005	0,275±0,016	0,211±0,004	40±0,74
PS2	0,002±0,0001	6,39±1,50	0,791±0,041	122±8,3	0,604±0,066	35,1±5,6	0,089±0,012	0,041±0,005	0,338±0,050	0,214±0,033	43±5,7
PS3	0,014±0,003	17±3,6	0,900±0,209	466±61	0,875±0,095	80±15	0,146±0,024	0,205±0,057	0,754±0,161	0,278±0,026	74±14
PS4	0,010±0,002	13±3,0	1,57±0,07	193±7,1	0,653±0,042	43,0±4,7	0,450±0,023	0,118±0,001	0,400±0,031	0,140±0,005	42±3,5
PS5	<76 ^a	<3,3	2,53±0,43	36,4±6,9	0,188±0,027	11,0±1,2	0,648±0,070	<53 ^a	0,163±0,037	0,136±0,019	10±2,4

Tabela 2.8. (Continuação).

Amostra	Al (%)	B (mg kg ⁻¹)	Ca (%)	Fe (mg kg ⁻¹)	K (%)	Mn (mg kg ⁻¹)	Mg (%)	Na (%)	P (%)	S (%)	Zn (mg kg ⁻¹)
PS6	0,006±0,002	27±4,0	0,367±0,021	78±7,0	0,967±0,084	29±2,1	0,323±0,011	<53 ^a	0,807±0,068	0,358±0,028	55±2,5
PS7	<76 ^a	1,86±0,22	0,412±0,107	<57	0,169±0,008	6,11±0,13	0,192±0,023	0,0030±0,0003	0,142±0,008	0,156±0,017	11±1,7
PS8	0,024±0,006	9,00±1,39	0,717±0,142	249±47	0,359±0,025	26±4,2	0,333±0,049	0,006±0,001	0,373±0,024	0,244±0,024	41±6,7
PS9	0,005±0,001	<3,3	0,037±0,009	83±18	0,255±0,032	11±1,5	0,122±0,010	<53 ^a	0,267±0,021	0,096±0,012	16±1,8
PS10	0,057±0,004	12±1,4	0,222±0,011	287±34	0,739±0,025	16±0,70	0,244±0,012	<53 ^a	0,586±0,034	1,45±0,07	36±3,0
PS11	<76 ^a	14±1,4	0,470±0,012	62±9,9	0,708±0,012	48±2,0	0,338±0,015	<53 ^a	0,801±0,009	0,426±0,019	33±1,2
PS12	<76 ^a	2,34±0,20	0,016±0,001	30±7,7	0,258±0,027	11±1,2	0,136±0,011	<53 ^a	0,258±0,034	0,095±0,006	16±0,50
PS13	0,011±0,001	<3,3	0,018±0,001	96±4,4	0,334±0,016	14±1,0	0,141±0,003	<53 ^a	0,315±0,006	0,096±0,014	23±2,9
EQ1	0,138±0,022	<3,3	11±1,4	2581±469	0,824±0,059	984±88	0,642±0,012	1,55±0,04	6,02±0,50	0,778±0,310	2071±244
EQ2	0,161±0,011	<3,3	14±0,83	2001±141	0,034±0,003	1209±165	0,534±0,011	1,43±0,10	4,29±0,09	0,607±0,044	2290±80
EQ3	0,142±0,012	18±2,0	11±0,40	3478±265	1,63±0,07	894±40	0,705±0,012	1,55±0,11	4,68±0,21	0,957±0,035	1832±75
EQ4	0,059±0,016	5,4±0,9	11±1,4	805±53	0,215±0,001	19±2,4	0,439±0,041	2,10±0,16	0,020±0,005	0,156±0,026	<4,6

Tabela 2.8. (Continuação).

Amostra	Al (%)	B (mg kg ⁻¹)	Ca (%)	Fe (mg kg ⁻¹)	K (%)	Mn (mg kg ⁻¹)	Mg (%)	Na (%)	P (%)	S (%)	Zn (mg kg ⁻¹)
EQ5	0,057±0,008	8,2±0,9	13±0,52	1671±174	0,040±0,011	199±18	0,553±0,007	1,77±0,11	5,30±0,33	0,816±0,097	768±65
RM1	0,104±0,032	<3,3	13±1,3	1760±213	0,116±0,032	35±6,3	0,375±0,071	1,49±0,09	0,040±0,009	0,176±0,012	8,5±2,1
RM2	0,078±0,014	<3,3	14±0,71	1580±349	0,221±0,011	34±2,7	0,642±0,014	1,80±0,04	0,034±0,002	0,401±0,014	<4,6
RM3	0,466±0,029	9,2±1,2	12±0,27	5226±188	0,436±0,037	904±42	0,680±0,009	1,21±0,012	2,02±0,045	0,555±0,024	2622±68
RM4	0,029±0,006	7,7±1,4	6,7±0,88	867±67	0,174±0,019	586±70	0,346±0,017	1,86±0,086	1,09±0,080	0,748±0,044	796±179

Resultados expressos como média ± intervalo de confiança a 95% (n = 3). PO = peixes ornamentais; PC = peixes de consumo; CO = coelhos; PS = pássaros silvestres; EQ = equinos; RM = ruminantes. ^a Valores expressos em mg kg⁻¹.

Tabela 2.9. Resultados obtidos para as concentrações encontradas em ração animal utilizando ICP-MS. Concentrações expressas em mg kg⁻¹.

Amostra	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	Se	Sr	V
PO1	0,785±0,089	8,00±0,91	0,137±0,023	17±3,7	1,55±0,06	12±1,7	0,902±0,310	0,365±0,075	0,038±0,003	0,619±0,155	15±2,3	0,723±0,102
PO2	3,52±0,50	11±2,3	0,163±0,014	13±3,4	2,19±0,22	15±2,4	1,86±0,18	1,09±0,06	0,059±0,013	2,89±0,53	39±8,7	1,45±0,49
PO3	1,90±0,40	32±5,3	0,165±0,017	16±3,1	2,18±0,39	24±4,0	2,08±0,30	1,09±0,21	0,078±0,011	1,58±0,16	18±3,1	1,43±0,24
PO4	1,03±0,22	12±2,1	0,280±0,023	9,55±1,68	1,07±0,30	23±5,2	1,67±0,41	0,435±0,118	0,048±0,008	0,795±0,204	7,25±1,07	0,703±0,186
PO5	0,814±0,094	8,90±0,84	0,190±0,049	3,82±0,82	1,54±0,03	14±0,51	1,00±0,19	0,366±0,012	0,051±0,013	0,640±0,060	9,01±0,45	0,692±0,004
PO6	1,50±0,17	43±2,1	0,129±0,018	16±1,8	1,24±0,19	21±1,6	1,62±0,06	1,33±0,40	0,065±0,015	1,11±0,03	19±2,2	1,52±0,23
PO7	1,06±0,14	22±1,6	0,062±0,002	13±0,18	1,22±0,27	22±4,6	1,18±0,53	0,575±0,128	<0,03	0,962±0,037	50±3,1	0,928±0,212
PO8	0,923±0,173	6,37±1,72	0,171±0,022	4,91±0,50	0,945±0,182	4,4±0,66	0,867±0,044	0,340±0,009	<0,03	0,528±0,119	10±1,7	0,502±0,278
PO9	1,64±0,14	17±1,8	0,331±0,014	7,28±0,66	1,80±0,39	21±1,8	1,57±0,93	0,475±0,016	0,055±0,018	1,36±0,08	23±1,3	0,885±0,131
PO10	1,51±0,04	42±2,2	0,166±0,011	13±0,26	2,83±0,15	20±1,5	1,45±0,19	1,35±0,26	0,063±0,010	0,837±0,070	6,92±0,34	1,40±0,10

Tabela 2.9. (Continuação).

Amostra	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	Se	Sr	V
PO11	0,548±0,171	7,24±2,04	0,058±0,017	4,09±1,13	0,818±0,210	45±12	0,715±0,142	0,489±0,086	<0,03	0,673±0,187	19±5,5	0,668±0,220
PO12	0,733±0,016	8,60±0,14	0,050±0,001	0,302±0,010	1,38±0,02	19±0,68	1,00±0,05	0,255±0,042	<0,03	1,72±0,02	19±0,42	0,462±0,017
PO13	1,19±0,12	23±2,7	0,131±0,021	0,274±0,043	1,86±0,05	19±3,7	1,38±0,30	0,821±0,028	0,050±0,011	0,925±0,157	11±1,5	0,993±0,116
PO14	0,131±0,034	3,52±0,26	<0,02	0,158±0,009	0,926±0,240	6,34±0,92	0,633±0,112	0,147±0,006	<0,03	<0,07	6,67±0,08	0,308±0,045
PC1	2,72±0,55	1,85±0,50	0,083±0,012	5,23±0,72	1,02±0,31	3,20±0,83	0,430±0,033	0,442±0,088	0,041±0,014	0,764±0,123	7,92±0,97	0,288±0,005
PC2	4,82±0,74	1,94±0,24	0,102±0,012	6,47±0,92	0,755±0,094	2,58±0,82	0,436±0,144	0,182±0,043	0,038±0,013	0,904±0,123	21±2,5	0,547±0,062
PC3	0,902±0,036	11±1,2	0,060±0,015	4,53±0,47	<0,7	21±0,88	1,09±0,17	0,353±0,038	0,051±0,003	1,91±0,08	23±0,90	0,665±0,075
PC4	<0,03	21±2,4	<0,02	0,083±0,012	0,498±0,050	8,24±0,48	0,494±0,051	0,300±0,014	0,039±0,010	0,088±0,001	<0,3	0,075±0,004
CO1	0,829±0,033	29±4,6	<0,02	0,521±0,114	14±2,1	16±2,3	2,67±0,65	<0,03	0,060±0,009	<0,07	176±21	1,81±0,14
CO2	0,870±0,187	43±11	<0,02	0,625±0,138	13±3,1	13±3,6	3,16±0,67	<0,03	0,058±0,008	<0,07	196±45	2,73±0,04
PS1	<0,03	2,60±0,70	<0,02	0,061±0,010	<0,7	6,63±0,85	0,572±0,083	<0,03	0,012±0,002	<0,07	35±3,4	<0,03

Tabela 2.9. (Continuação).

Amostra	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	Se	Sr	V
PS2	<0,03	1,63±0,12	<0,02	0,053±0,002	<0,7	5,16±1,16	0,529±0,117	<0,03	<0,03	<0,07	36±1,5	<0,03
PS3	<0,03	10±0,48	<0,02	0,691±0,071	1,60±0,15	27±5,8	1,82±0,30	<0,03	<0,03	<0,07	50±6,7	<0,03
PS4	<0,03	10±2,0	<0,02	0,084±0,019	<0,7	8,02±1,74	1,33±0,14	<0,03	<0,03	<0,07	11±3,3	<0,03
PS5	0,103±0,005	<0,2	<0,02	<0,03	0,682±0,071	2,16±0,26	1,15±0,09	<0,03	<0,03	<0,07	24±6,7	<0,03
PS6	<0,03	8,43±1,39	<0,02	<0,03	<0,7	14±3,0	0,490±0,036	<0,03	<0,03	<0,07	23±5,8	<0,03
PS7	<0,03	0,823±0,165	<0,02	0,019±0,004	<0,7	0,873±0,253	0,145±0,008	<0,03	<0,03	<0,07	3,53±0,10	<0,03
PS8	<0,03	1,68±0,26	<0,02	<0,03	<0,7	<0,2	0,875±0,129	<0,03	<0,03	<0,07	6,15±0,59	<0,03
PS9	0,088±0,013	1,15±0,06	<0,02	0,073±0,009	0,772±0,011	6,37±0,21	1,82±0,02	<0,03	<0,03	<0,07	1,90±0,24	0,205±0,038
PS10	<0,03	1,89±0,08	<0,02	0,029±0,001	<0,7	1,97±0,11	0,479±0,017	<0,03	<0,03	<0,07	15±0,53	<0,03
PS11	<0,03	12±2,3	<0,02	0,118±0,002	<0,7	3,67±0,12	0,540±0,045	<0,03	<0,03	<0,07	23±4,2	<0,03
PS12	<0,03	0,759±0,035	<0,02	<0,03	<0,7	9,45±1,27	3,71±0,95	<0,03	<0,03	<0,07	1,13±0,03	<0,03
PS13	<0,03	1,46±0,32	<0,02	0,060±0,015	0,517±0,128	6,37±1,11	0,416±0,065	<0,03	<0,03	<0,07	1,58±0,35	0,189±0,002

Tabela 2.9. (Continuação).

Amostra	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	Se	Sr	V
EQ1	6,35±0,85	363±27	0,580±0,061	36±2,3	66±17	1146±305	14±5,8	3,40±0,59	0,154±0,019	15±3,4	2682±263	26±3,2
EQ2	4,27±1,10	387±120	0,143±0,022	53±7,4	18±1,2	1124±293	11±2,8	2,05±0,24	0,076±0,001	13±3,1	2239±558	13±3,5
EQ3	3,86±0,43	17±1,8	3,55±0,13	24±5,2	85±3,7	1469±70	9,27±0,25	1,43±0,34	0,249±0,035	10±0,68	952±59	17±0,89
EQ4	2,46±0,58	26±7,1	<0,02	0,345±0,085	4,23±1,13	13±4,2	3,85±1,08	<0,03	0,034±0,002	<0,07	763±178	1,83±0,29
EQ5	5,07±0,78	44±6,7	0,140±0,004	29±3,8	37±5,3	203±21	6,98±0,77	2,13±0,53	0,190±0,081	15±0,93	634±38	25±2,0
RM1	3,59±0,58	<0,2	<0,02	1,18±0,18	10±0,57	20±5,1	8,54±1,14	3,34±0,17	<0,03	<0,07	1656±6,62	4,03±1,20
RM2	5,26±0,21	66±11	<0,02	1,12±0,05	11±2,1	19±2,9	8,08±1,47	1,60±0,43	0,077±0,023	<0,07	1503±285	4,44±1,26
RM3	2,99±0,28	184±34	0,106±0,009	11±1,5	42±8,6	3436±558	11±1,6	7,29±0,01	0,165±0,009	7,72±2,05	1375±199	13±2,6
RM4	3,50±0,54	61±2,3	0,160±0,022	6,87±1,08	15±2,0	391±19	5,09±1,18	0,863±0,211	0,085±0,020	<0,07	503±80	9,79±1,38

Resultados expressos como média (mg kg⁻¹) ± intervalo de confiança a 95% (n = 3). PO = peixes ornamentais; PC = peixes de consumo; CO = coelhos; PS = pássaros silvestres; EQ = equinos; RM = ruminantes.

Com base no resumo estatístico para as concentrações encontradas nas amostras de rações para peixes ornamentais, **Tabela 2.10**, foi possível perceber que os elementos possuem a seguinte ordem decrescente de concentração: Ca > P > K > Na > S > Mg > Al > Fe > Zn > Mn > Cu > Sr > Ba > B > Co > Cr > Ni > As > Se > V > Pb > Cd > Sb.

Tabela 2.10. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para peixes ornamentais.

Elemento	Média	Mediana	Máximo	Mínimo	n
Al (%)	0,127	0,074	0,341	0,014	14
B (mg kg ⁻¹)	14	18	20	6,24	5
Ca (%)	1,60	1,44	3,37	0,162	14
Fe (mg kg ⁻¹)	521	465	954	136	14
K (%)	1,08	1,01	1,82	0,628	14
Mg (%)	0,214	0,208	0,285	0,147	14
Mn (mg kg ⁻¹)	92	79	180	15	13
Na (%)	0,533	0,608	1,15	0,170	14
P (%)	1,31	1,15	2,79	0,355	14
S (%)	0,456	0,443	0,890	0,177	14
Zn (mg kg ⁻¹)	151	151	296	31	14
As (mg kg ⁻¹)	1,23	1,05	3,52	0,131	14
Ba (mg kg ⁻¹)	17	12	43	3,52	14
Cd (mg kg ⁻¹)	0,156	0,163	0,331	0,050	13
Co (mg kg ⁻¹)	8,46	8,42	17	0,158	14
Cr (mg kg ⁻¹)	1,54	1,46	2,83	0,818	14
Cu (mg kg ⁻¹)	19	20	45	4,40	14
Ni (mg kg ⁻¹)	1,28	1,28	2,08	0,633	14
Pb (mg kg ⁻¹)	0,652	0,482	1,35	0,147	14
Sb (mg kg ⁻¹)	0,056	0,055	0,078	0,038	9
Se (mg kg ⁻¹)	1,13	0,925	2,89	0,528	13
Sr (mg kg ⁻¹)	18	17	50	6,67	14
V (mg kg ⁻¹)	0,905	0,804	1,52	0,308	14

Comparando as concentrações médias determinadas com os valores expressados nos rótulos dos fabricantes para Cu (6,80 mg kg⁻¹), Fe (68,0 mg kg⁻¹), Mn (54,4 mg kg⁻¹), Se (0,20 mg kg⁻¹) e Zn (68,0 mg kg⁻¹), os valores reportados, foram 2,8; 7,7; 1,5; 5,5 e 2,2 vezes , respectivamente, menor do que os determinados pelos métodos desenvolvidos. Estando de acordo com os

valores mínimos reportados pelos fabricantes. Comparando os valores obtidos, de acordo com o que é requerido pelo MAPA, as concentrações médias de Ca (1,60%) estavam abaixo do valor reportado nos rótulos dos produtos, que expressaram uma concentração média mínima de 1,65% e máxima de 2,92%. Para P, as concentrações médias reportadas nos produtos foi 0,81%, e foram encontradas concentrações de 1,31%, 1,62 vezes maior do que o reportado pelos fabricantes. No entanto, esses valores encontrados estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo MAPA.

Para as rações para peixes de consumo, **Tabela 2.11**, foi possível perceber que os elementos possuem a seguinte ordem decrescente de concentração: P > Ca > K > Na > S > Mg > Fe > Al > Zn > Mn > Sr > Ba > Cu > Co > As > Se > Cr > Ni > V > Pb > Cd > Sb, com B com valor menor do que o LoQ. A concentração média para P (1,36%) foi concordante com a AAFCO, que estabelece um limite mínimo de 0,6% para esse elemento (AAFCO, 2003).

Os fabricantes não reportaram valores mínimos para os elementos não regulamentados pela legislação, somente para Ca e P, que requerem a informação de valores máximo e mínimo para Ca e de mínimo para P. As concentrações médias encontradas para Ca (1,30%), estavam dentro da faixa reportada nos rótulos dos produtos, que expressavam uma concentração média mínima de 0,97% e máxima de 1,51%. Por outro lado, a concentração média mínima para P, reportada nos rótulos do produtos foi 0,93% e foram encontradas concentrações médias de 1,36%, uma quantidade 1,46 vezes maior do que o reportado pelos fabricantes, esses valores encontrados estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo MAPA.

Tabela 2.11. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para peixes de consumo humano.

Elemento	Média	Mediana	Máximo	Mínimo	n
Al (%)	0,024	0,024	0,036	0,011	2
B (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ca (%)	1,30	1,21	2,00	0,787	4
Fe (mg kg ⁻¹)	0,027	0,014	0,054	0,013	3
K (%)	0,781	0,783	0,876	0,681	4
Mg (%)	0,204	0,181	0,300	0,155	4
Mn (mg kg ⁻¹)	46	42	84	17	4
Na (%)	0,456	0,562	0,667	0,033	4
P (%)	1,36	1,39	1,66	1,01	4
S (%)	0,393	0,433	0,573	0,134	4
Zn (mg kg ⁻¹)	122	61	316	49	4
As (mg kg ⁻¹)	2,81	2,72	4,82	0,902	3
Ba (mg kg ⁻¹)	8,95	6,47	21	1,85	4
Cd (mg kg ⁻¹)	0,082	0,083	0,102	0,060	3
Co (mg kg ⁻¹)	4,08	4,88	6,47	0,083	4
Cr (mg kg ⁻¹)	0,758	0,755	1,02	0,498	3
Cu (mg kg ⁻¹)	8,76	5,72	21	2,58	4
Ni (mg kg ⁻¹)	0,613	0,465	1,09	0,430	4
Pb (mg kg ⁻¹)	0,319	0,327	0,442	0,182	4
Sb (mg kg ⁻¹)	0,042	0,040	0,051	0,038	4
Se (mg kg ⁻¹)	0,917	0,834	1,91	0,088	4
Sr (mg kg ⁻¹)	17	21	23	7,92	3
V (mg kg ⁻¹)	0,394	0,418	0,665	0,075	4

n.d. = não determinado.

Em outros estudos, Copat *et al.* (2013) determinaram concentrações médias (em mg kg⁻¹) de As (5,007), Cd (0,0017), Cr (0,049), Pb (0,018), Mn (1,250), Ni (0,087), V (0,168) e Zn (5,521) em amostras de peixes marinhos da Croácia. Neste mesmo tipo matriz, porém, do Mar Mediterrâneo, Bilandžić *et al.* (2014) encontraram concentrações médias de Zn (6,15 ± 3,70 mg kg⁻¹). Kwok *et al.* (2014) determinaram em músculo de Tilápias pequenas, médias e grandes, concentrações em mg kg⁻¹, respectivamente, de: 2,21, 4,61 e 8,55 (Cd), 1,66, 2,14 e 2,48 (Cr), 2,76, 5,21 e 8,73 (Cu), 4,07, 6,80 e 8,64 (Pb), e 21,2, 40,3 e 45,9 (Zn), e em vísceras, respectivamente: 2,47, 4,53 e 8,08 (Cd), 12,5, 18,2 e 18,8 (Cr), 9,93, 17,6 e 14,5 (Cu), 17,4, 21,7 e 26,2 (Pb), e 57,2,

57,0 e 65,6 (Zn). Noël *et al.* (2013) encontraram em amostras de peixes de água doce da França concentrações médias (mg kg^{-1}) de: 0,101 (As), 0,011 (Cd) e 0,024 (Pb).

Com base no resumo estatístico obtido para as concentrações obtidas nas amostras de ração para coelhos, **Tabela 2.12**, foi possível perceber que os elementos possuem a seguinte ordem decrescente de concentração: Ca > K > P > Mg > S > Na > Al > Fe > Sr > Mn > Zn > Ba > B > Cu > Cr > Ni > V > As > Co > Sb, com Cd, Pb e Se com valores menores do que o LoQ.

Tabela 2.12. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para coelhos.

Elemento	Média	Mediana	Máximo	Mínimo	n
Al (%)	0,123	0,123	0,124	0,121	2
B (mg kg^{-1})	14	14	15	14	2
Ca (%)	1,94	1,94	2,00	1,88	2
Fe (%)	0,130	0,130	0,146	0,115	2
K (%)	1,04	1,04	1,05	1,02	2
Mg (%)	0,359	0,359	0,368	0,350	2
Mn (mg kg^{-1})	120	120	130	111	2
Na (%)	0,147	0,147	0,223	0,071	2
P (%)	0,865	0,865	0,923	0,807	2
S (%)	0,162	0,162	0,172	0,152	2
Zn (mg kg^{-1})	68	68	72	64	2
As (mg kg^{-1})	0,850	0,850	0,870	0,829	2
Ba (mg kg^{-1})	36	36	43	29	2
Cd (mg kg^{-1})	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Co (mg kg^{-1})	0,573	0,573	0,625	0,521	2
Cr (mg kg^{-1})	13	13	14	13	2
Cu (mg kg^{-1})	15	15	16	13	2
Ni (mg kg^{-1})	2,92	2,92	3,16	2,67	2
Pb (mg kg^{-1})	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sb (mg kg^{-1})	0,059	0,059	0,060	0,058	2
Se (mg kg^{-1})	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sr (mg kg^{-1})	186	186	196	176	2
V (mg kg^{-1})	2,27	2,27	2,81	2,73	2

n.d. = não determinado.

A legislação do MAPA estabelece que os fabricantes expressem nos rótulos da ração destinada a coelhos, os valores máximo e mínimo para Ca e mínimo para P. Já para os demais elementos, deve ser expresso o valor mínimo. Nas amostras foi possível observar concentrações médias de Ca (1,94%) e P (0,865%), entretanto, não foi possível comparar com os valores informados pelos fabricantes porque as amostras que foram adquiridas são comercializadas a granel e não havia informação acerca do fabricante. Na literatura foi possível perceber que há uma grande preocupação com a ração para coelhos para fins ornamentais ou para a prática do abate, na busca por alimentos cada vez melhor e de boa qualidade (Beshkenadze *et al.*, 2016; Gidenne *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018).

Com base no resumo estatístico obtido para as concentrações obtidas nas amostras de ração para pássaros silvestres, **Tabela 2.13**, foi possível perceber que os elementos possuem a seguinte ordem decrescente de concentração: Ca > K > P > S > Mg > Na > Fe > Al > Zn > Mn > Sr > B > Cu > Ba > Ni > Cr > V > Co > As, com Cd, Pb, Sb e Se com valores menores do que o LoQ.

Tabela 2.13. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para pássaros silvestres.

Elemento	Média	Mediana	Máximo	Mínimo	n
Al (%)	0,015	0,010	0,057	0,0025	9
B (mg kg ⁻¹)	11	11	27	1,86	10
Ca (%)	0,670	0,470	2,53	0,016	13
Fe (%)	0,015	0,010	0,047	0,003	12
K (%)	0,515	0,590	0,967	0,169	13
Mg (%)	0,250	0,192	0,648	0,084	13
Mn (mg kg ⁻¹)	27	22	80	6,11	13
Na (%)	0,073	0,054	0,205	0,003	6
P (%)	0,421	0,338	0,807	0,142	13
S (%)	0,300	0,211	1,45	0,095	13
Zn (mg kg ⁻¹)	34	36	74	10	13
As (mg kg ⁻¹)	0,096	0,096	0,103	0,088	2
Ba (mg kg ⁻¹)	4,39	1,79	12	0,759	13
Cd (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Co (mg kg ⁻¹)	0,141	0,061	0,691	0,019	9
Cr (mg kg ⁻¹)	0,893	0,727	1,60	0,517	4
Cu (mg kg ⁻¹)	7,60	6,37	27	0,873	12
Ni (mg kg ⁻¹)	1,07	0,572	3,71	0,145	13
Pb (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sb (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Se (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sr (mg kg ⁻¹)	18	16	50	1,13	13
V (mg kg ⁻¹)	0,197	0,197	0,205	0,189	2

A legislação do MAPA estabelece que os fabricantes expressem nos rótulos da ração destinada a pássaros silvestres, os valores máximo e mínimo para Ca e mínimo para P. Já para os demais elementos, deve ser expresso o valor mínimo. Nas amostras foi possível observar concentrações médias de Ca (0,670%) e P (0,421%), entretanto, não foi possível comparar com os valores informados pelos fabricantes porque as amostras que foram adquiridas são comercializadas a granel e não havia informação acerca do fabricante.

Com base no resumo estatístico obtido para as concentrações obtidas nas amostras de ração para equinos, **Tabela 2.14**, foi possível perceber que os elementos possuem a seguinte ordem decrescente de concentração: Ca > P >

Na > S > Mg > K > Fe > Zn > Sr > Al > Cu > Mn > Ba > Cr > Co > V > Se > B > Ni > As > Pb > Cd > Sb.

Tabela 2.14. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para equinos.

Elemento	Média	Mediana	Máximo	Mínimo	n
Al (%)	0,111	0,138	0,161	0,057	5
B (mg kg ⁻¹)	11	8,20	18	5,40	3
Ca (%)	12	12	14	11	5
Fe (%)	0,211	0,200	0,348	0,081	5
K (%)	0,549	0,215	1,63	0,034	5
Mg (%)	0,575	0,553	0,705	0,439	5
Mn (mg kg ⁻¹)	661	894	1209	19	5
Na (%)	1,68	1,55	2,10	1,43	5
P (%)	4,06	4,68	6,02	0,020	5
S (%)	0,663	0,778	0,957	0,156	5
Zn (mg kg ⁻¹)	1740	1952	2290	768	4
As (mg kg ⁻¹)	4,40	4,27	6,35	2,46	5
Ba (mg kg ⁻¹)	167	44	387	14	5
Cd (mg kg ⁻¹)	1,10	0,362	3,55	0,140	5
Co (mg kg ⁻¹)	29	30	53	0,345	5
Cr (mg kg ⁻¹)	42	37	85	4,23	5
Cu (mg kg ⁻¹)	811	1146	1469	13	5
Ni (mg kg ⁻¹)	9,10	9,27	15	3,85	5
Pb (mg kg ⁻¹)	2,25	2,09	3,40	1,43	4
Sb (mg kg ⁻¹)	0,141	0,154	0,249	0,034	5
Se (mg kg ⁻¹)	13	14	15	10	5
Sr (mg kg ⁻¹)	1454	952	2682	634	5
V (mg kg ⁻¹)	17	17	26	1,83	5

A legislação do MAPA estabelece que os fabricantes expressem nos rótulos da ração destinada a equinos, os valores máximo e mínimo para Ca e mínimo para P. Já para os demais elementos, deve ser expresso o valor mínimo. Nas amostras foi possível observar concentrações médias de Ca (12%) e P (4,06%), estando de acordo com os valores informados nos rótulos dos fabricantes: Ca mínimo (11,8%) e máximo (20%), P mínimo (0,800%). Para os valores mínimos dos microelementos informados pelos fabricantes, em mg kg⁻¹: 21 (Co), 1200 (Cu), 1000 (Fe) e 2200 (Zn), estavam com valores acima do

mínimo informado para Fe (2107 mg kg⁻¹) e Co (29 mg kg⁻¹), e abaixo do mínimo informado para Cu (881 mg kg⁻¹) e Zn (1740 mg kg⁻¹).

Na literatura, Paßlack *et al.* (2014) determinaram em fígados e rins de equinos, respectivamente, concentrações (em mg kg⁻¹) de: 0,230 e 0,340 (Ba), 0,798 e 8,17 (Cd), 0,116 e 85 (Cr), 4,24 e 4,45 (Cu), 1,19 e 0,875 (Mn), 0,0823 e 0,0340 (Pb), 0,0148 e 0,0108 (Sb), 0,131 e 0,739 (Se), 0,0735 e 0,170 (Sr) e 21 e 22 (Zn). Topczewska (2012) encontraram em cabelo de cavalos, concentrações (em mg kg⁻¹) de: 0,678 (B), 0,324 (Cr) e 0,0378 (Ni).

Com base no resumo estatístico obtido para as concentrações obtidas nas amostras de ração para ruminantes, **Tabela 2.15**, foi possível perceber que os elementos possuem a seguinte ordem decrescente de concentração: Ca > Na > P > Mg > S > K > Fe > Al > Sr > Cu > Zn > Mn > Ba > Cr > B > Ni > V > Co > As > Pb > Cd > Sb, com Se com valor menor do que o LoQ.

A legislação emitida pelo MAPA estabelece que os fabricantes expressem nos rótulos da ração destinada a ruminantes, os valores máximo e mínimo para Ca e mínimo para os demais elementos químicos. Nas amostras foi possível observar concentrações médias de Ca (11%) e P (0,796%), estando de acordo com os valores informados nos rótulos dos fabricantes: Ca mínimo (11%) e máximo (14%), P mínimo (0,020%). Para os valores mínimos dos microelementos informados pelos fabricantes, em mg kg⁻¹: 5,0 (Co), 500 (Cu), 3400 (Fe) e 2000 (Zn), os valores obtidos estavam abaixo do mínimo informado para Co (1,12 mg kg⁻¹), Cu (19 mg kg⁻¹), Fe (2358 mg kg⁻¹) e Zn (4,30 mg kg⁻¹).

Tabela 2.15. Resumo estatístico das concentrações de constituintes inorgânicos em amostras de ração para ruminantes.

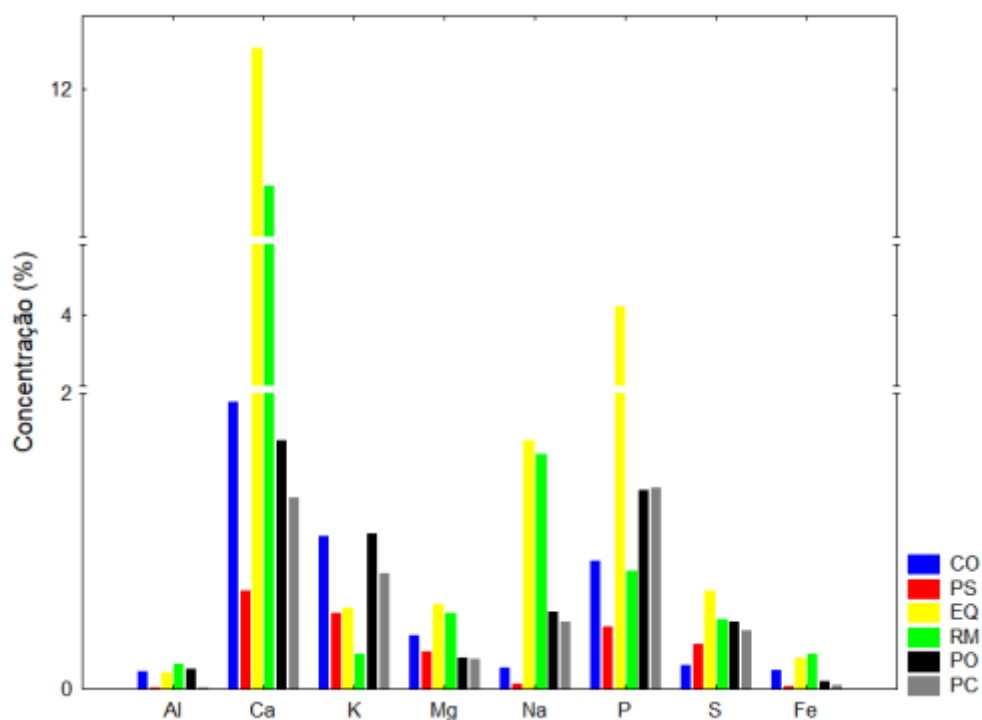
Elemento	Média	Mediana	Máximo	Mínimo	n
Al (%)	0,169	0,091	0,466	0,029	4
B (mg kg ⁻¹)	8,45	8,45	9,20	7,70	2
Ca (%)	11	12	14	6,68	4
Fe (%)	0,236	0,167	0,523	0,087	4
K (%)	0,237	0,198	0,436	0,116	4
Mg (%)	0,511	0,509	0,680	0,346	4
Mn (mg kg ⁻¹)	390	310	904	34	4
Na (%)	1,59	1,65	1,86	1,21	4
P (%)	0,796	0,565	2,02	0,034	4
S (%)	0,470	0,478	0,748	0,176	4
Zn (mg kg ⁻¹)	858	402	2622	4,30	4
As (mg kg ⁻¹)	3,84	3,55	5,26	2,99	4
Ba (mg kg ⁻¹)	104	66	184	61	3
Cd (mg kg ⁻¹)	0,133	0,133	0,160	0,106	2
Co (mg kg ⁻¹)	4,99	4,03	11	1,12	4
Cr (mg kg ⁻¹)	20	13	42	10	4
Cu (mg kg ⁻¹)	966	206	3436	19	4
Ni (mg kg ⁻¹)	8,08	8,31	11	5,09	4
Pb (mg kg ⁻¹)	3,27	2,47	7,29	0,863	4
Sb (mg kg ⁻¹)	0,109	0,085	0,165	0,077	3
Se (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sr (mg kg ⁻¹)	1259	1439	1656	503	4
V (mg kg ⁻¹)	7,79	7,12	13	4,03	4

Na literatura, Schöne *et al.* (2013) avaliaram diferentes alimentos para ruminantes e determinaram os teores de Se, em mg kg⁻¹: cevada (0,0020), trigo (0,052), mistura de grãos (0,027), milho (0,046), farelo de soja (0,149), grãos de soja (0,084), farelo de colza (0,128), colza (*Brassica napus*) (0,059), resíduo da produção de cerveja (0,059), alfafa (0,262), pera (0,022), grama (0,036) e concentrado de selênio (33). Spears *et al.* (2017) determinaram cromo em diversos alimentos para ruminantes, obtendo concentrações, em mg kg⁻¹: milho inteiro (0,026), milho processado (0,049), semente de algodão (0,094), aveia inteira (0,025), grãos de soja inteiros (0,069), farelo de soja (0,208), trigo inteiro (0,041), alfafa (0,522), silagem de milho (0,220) e feno de capim (0,155).

Comparando os elementos de acordo com os tipos de ração animal, foi possível perceber que dentre os macromelementos, os maiores teores de Al foram encontrados nas amostras de ração para ruminantes, K em ração para peixes ornamentais, Fe em ração para ruminantes e, Ca, Mg, Na, P e S foram maiores em ração para equinos, conforme **Figura 2.4**.

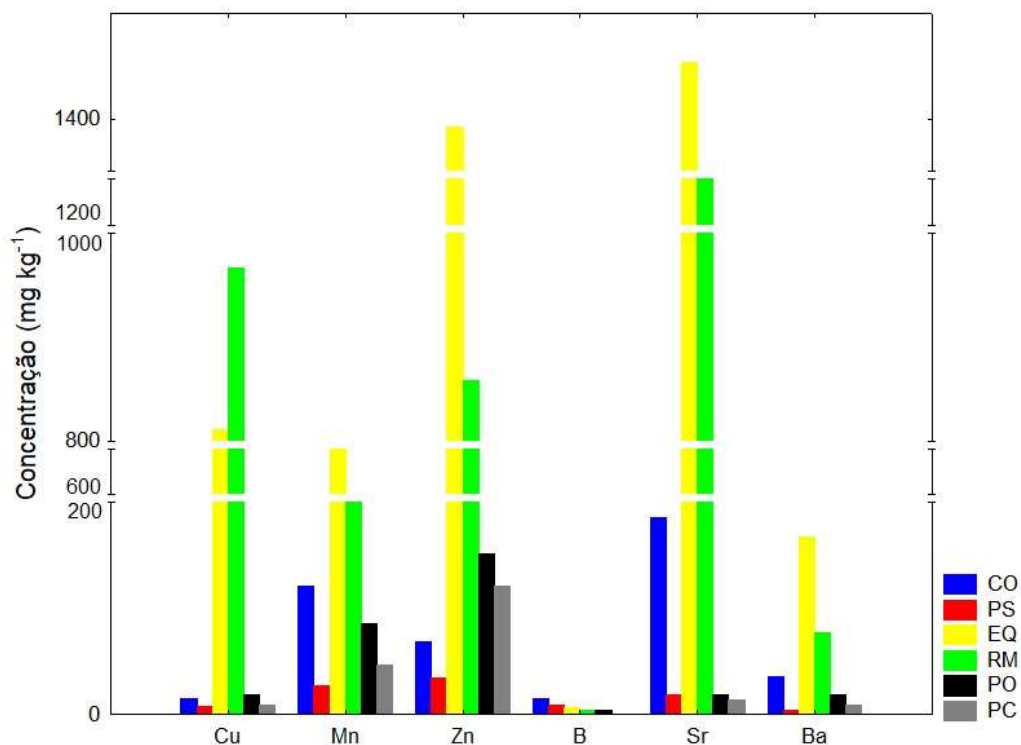
Com relação aos microelementos, Cu possui maiores teores em ração para ruminantes, B em ração para coelhos e, Ba, Mn, Sr e Zn em ração para equinos, como mostrado na **Figura 2.5**.

Figura 2.4. Comparação das concentrações médias dos macromelementos nos cinco tipos de ração animal.



Legenda: CO – coelhos, PS – pássaros silvestres, EQ – equinos, RM – ruminantes, PO – peixes ornamentais e PC – peixes de consumo humano.

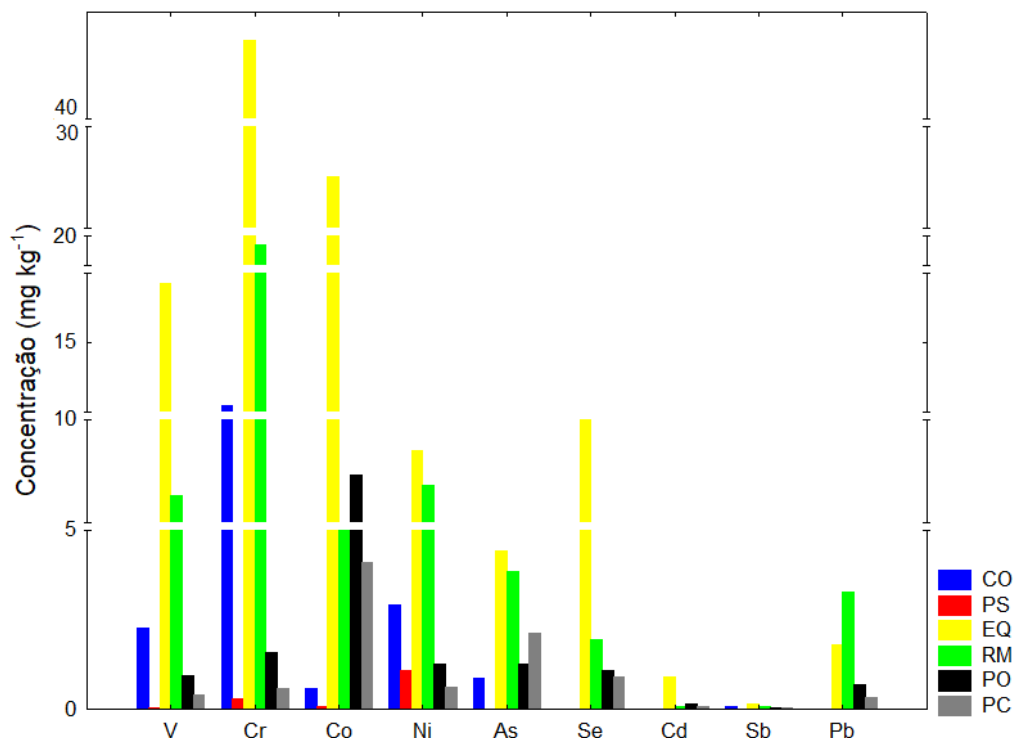
Figura 2.5. Comparação das concentrações médias dos microelementos nos cinco tipos de ração animal.



Legenda: CO – coelhos, PS – pássaros silvestres, EQ – equinos, RM – ruminantes, PO – peixes ornamentais e PC – peixes de consumo humano.

Para os elementos traço, as maiores concentrações para Pb foram obtidas em ração para ruminantes e, As, Cd, Co, Cr, Ni, Sb, Se e V foram obtidos em ração para equinos, conforme **Figura 2.6**.

Figura 2.6. Comparação das concentrações médias dos elementos traço nos cinco tipos de ração animal.



CO – coelhos, PS – pássaros silvestres, EQ – equinos, RM – ruminantes, PO – peixes ornamentais e PC – peixes de consumo humano.

2.4.5. Análise multivariada de dados

2.4.5.1. Análise de componentes principais

As determinações de 23 elementos em quarenta e duas amostras resultaram em uma matriz de dados de 23 x 42. Primeiramente, os dados foram autoescalados por causa das diferentes ordens de magnitude de concentração das amostras. A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para avaliar possíveis tendências entre as amostras de ração animal. Os dados foram pré processados usando o autoescalamento. As três primeiras componentes principais (PCs) descreveram 76,52% da variância total dos dados e forneceram informações que possibilitaram realizar uma análise discriminatória das amostras. A PC1 explicou 59,14% da variância total,

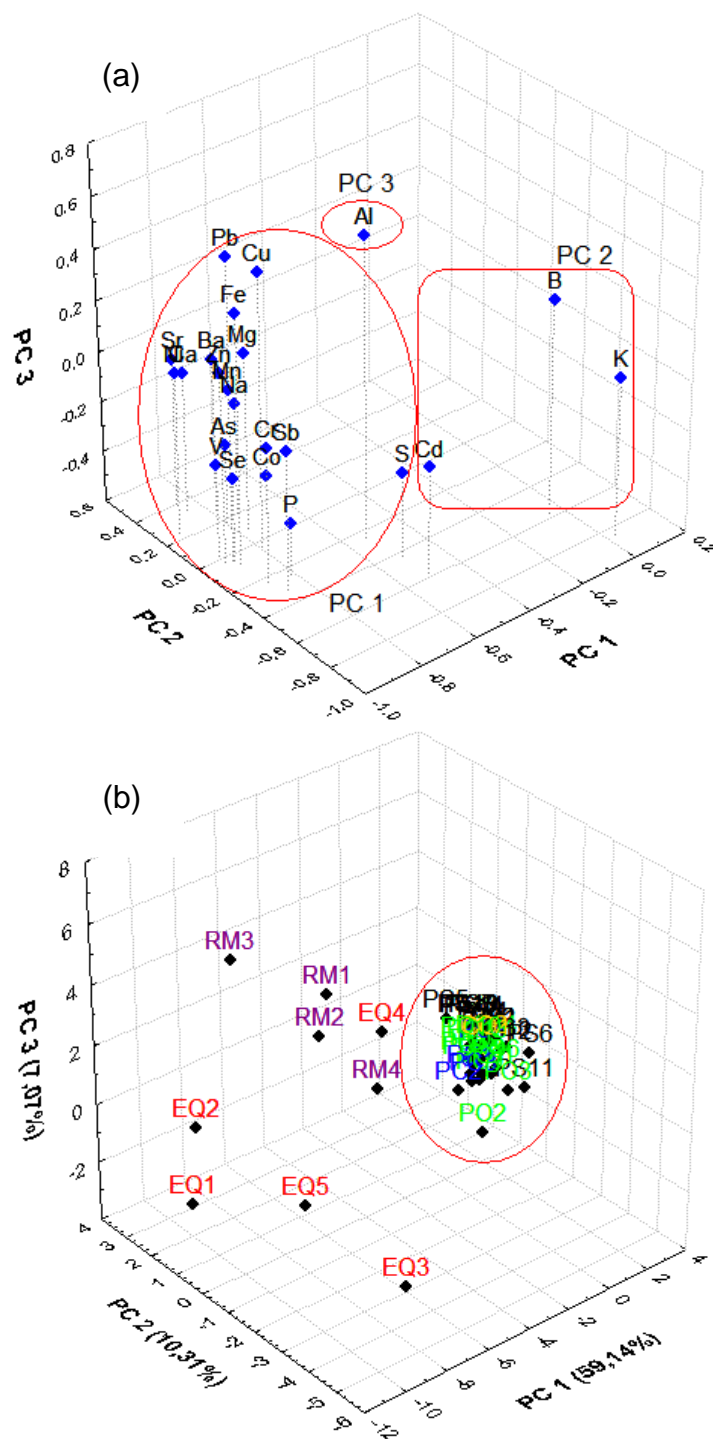
seguida pela PC2 (10,31%) e PC3 (7,07%). Os valores de pesos para as concentrações dos elementos estão apresentados na **Tabela 2.16**.

Observando os gráficos das três primeiras componentes principais, **Figura 2.7**, foi possível perceber a formação de dois grupos, um grupo formado pelas amostras de ração para equinos e para ruminantes, que são influenciadas na PC1 pela maioria dos elementos, entretanto, foi possível perceber que a amostra RM 3 tende a distanciar-se das outras por apresentar maiores teores de Al frente às demais, conforme observado na PC3. O outro grupo foi formado pelas amostras de ração para coelhos, pássaros silvestres, peixes ornamentais e peixes de consumo humano. Esses tipos de amostras distinguem-se dos dois tipos anteriores principalmente por causa dos teores de K, devido à sua influência na PC2.

Tabela 2.16. Valores de pesos das variáveis para as três primeiras componentes principais.

Elemento	PC 1	PC 2	PC 3
Al	-0,531	-0,243	0,583
As	-0,796	0,174	-0,281
B	-0,044	-0,577	0,255
Ba	-0,779	0,273	0,004
Ca	-0,846	0,339	-0,043
Cd	-0,506	-0,579	-0,175
Co	-0,785	-0,069	-0,303
Cr	-0,884	-0,236	-0,066
Cu	-0,789	-0,037	0,482
Fe	-0,891	-0,073	0,383
K	0,034	-0,843	0,024
Mg	-0,766	0,095	0,103
Mn	-0,898	-0,037	0,079
Na	-0,743	0,202	-0,159
Ni	-0,929	0,241	0,038
P	-0,808	-0,248	-0,396
Pb	-0,789	0,155	0,459
S	-0,511	-0,433	-0,260
Sb	-0,862	-0,317	-0,052
Se	-0,850	0,041	-0,272
Sr	-0,850	0,400	-0,012
V	-0,914	0,021	-0,234
Zn	-0,919	-0,025	0,149
Variância Total (%)	59,14	10,31	7,07
Variância Cumulativa (%)	59,14	69,45	76,52

Figura 2.7. Gráficos tridimensionais para a PC3 x PC2 x PC1 para os elementos (a) e as amostras de ração animal (b).

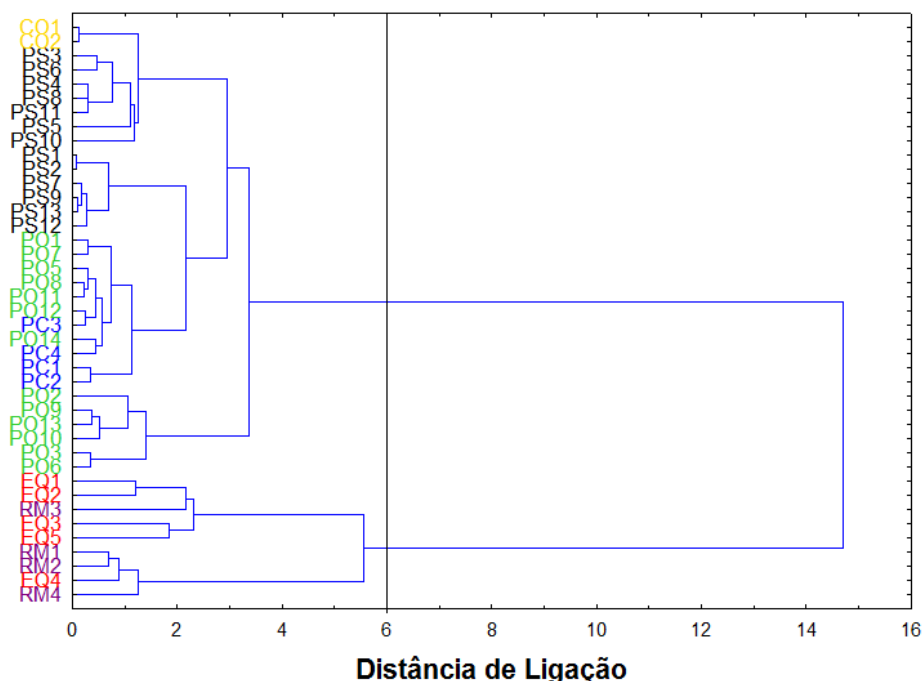


Legenda: CO – coelhos, PS – pássaros silvestres, EQ – equinos, RM – ruminantes, PO – peixes ornamentais e PC – peixes de consumo humano.

2.4.5.2. Análise de agrupamento hierárquico

Os resultados obtidos também foram avaliados por análise de agrupamento hierárquico (HCA). Os dados foram autoescalados e os interpontos foram avaliados usando o método de ligação, e a distância Euclidiana foi aplicada para calcular as distâncias interpontos e as similaridades das amostras, conforme pode ser observado no dendograma obtido na **Figura 2.8**. Este gráfico permite visualizar a mesma tendência de separação fornecida pela PCA, além da tendência de formação de subgrupos, sendo um com as amostras de ração para coelhos, o segundo com as amostras para pássaros silvestres, onde as amostras PS 3, 6, 4, 8, 11 e 10 possuem maiores concentrações de B e K do que as amostras PS 1, 2, 7, 9 12 e 13. E um terceiro subgrupo com as amostras de ração para peixes ornamentais e de consumo, sendo que as amostras PO 2, 9, 13, 10, 3 e 6, possuem maiores teores de K frente às demais amostras para PO e PC.

Figura 2.8. Dendograma obtido para as amostras de ração animal através do método de ligação de Ward e da distância Euclidiana.



Legenda: CO – coelhos, PS – pássaros silvestres, EQ – equinos, RM – ruminantes, PO – peixes ornamentais e PC – peixes de consumo humano.

2.5. Considerações finais

Neste trabalho, os planejamentos fatorial fracionário 2^{5-2} e Doehlert aplicados na otimização do procedimento de decomposição das amostras assistida por radiação micro-ondas e operacionais do espectrômetro foram adequados para obtenção das condições ótimas estabelecidas.

O procedimento de preparo das amostras de rações possibilitou concentração ácida residual de aproximadamente $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ nas soluções digeridas, permitindo a introdução para análise por ICP OES, e após uma simples diluição para análise por ICP-MS.

Os métodos baseados em ICP foram exatos e precisos para a determinação de macrossubstâncias (Al, Ca, Fe, K, Na, Mg, P e S), microelementos (B, Ba, Cu, Mn, Sr e Zn) e elementos traço (As, Cd, Co, Cr, Ni, Sb, Se, Pb e V) presentes em amostras de rações animais (coelho, pássaros silvestres, equinos, ruminantes, peixes ornamentais e peixes de consumo).

A aplicação da análise multivariada de dados, através da PCA e HCA, possibilitou a observação de tendências de formação de grupos de acordo com o tipo de ração indicada para cada tipo de animal.

Neste estudo, as concentrações obtidas para os elementos informados nos rótulos das rações estavam concordantes com os parâmetros exigidos pelo MAPA, entretanto, torna-se necessário um maior controle sobre os elementos químicos presentes, uma vez que foram encontrados elementos potencialmente tóxicos, tais como As, Cd, Cr, Sb, Ni e Pb. Para avaliar se a forma na qual estes elementos químicos estão presentes são realmente tóxicas, estudos de análise de especificação química devem ser realizados.

Capítulo 3. Determinação de nutrientes em caldo de cana usando análise direta na forma de suspensão e detecção por ICP OES

3.1. Introdução

A cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem sido cultivada em cerca de 200 países, sendo uma importante matriz energética em países tropicais e subtropicais, tais como China, Índia, Tailândia e Austrália, que junto com o Brasil, são os maiores produtores mundiais de cana de açúcar, com 25% da produção total (Brochier *et al.*, 2016; Ramasubramanian *et al.*, 2014; Sindhu *et al.*, 2016; Suganthi *et al.*, 2018; Zuin *et al.*, 2006).

A partir da cana de açúcar, uma variedade de produtos pode ser obtida, tais como cachaça, açúcar, melaço, rapadura, caldo de cana, etc. Seu extrato padronizado, caldo de cana, é uma bebida energética não alcoólica que é amplamente consumida no Brasil (Brasil^c, 2005; Brochier *et al.*, 2016; Nogueira *et al.*, 2009; Serafim *et al.*, 2016; Zuin *et al.*, 2006). O caldo de cana é uma fonte natural de nutrição, conforme **Tabela 3.1**, sendo importante avaliar a composição mineral dessa bebida (Nogueira *et al.*, 2009; Tormen *et al.*, 2011).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução n° 269 de 22 de setembro de 2005, estabelece a ingestão diária recomendada (IDR) dos minerais Ca, Cu, Fe e Mg, para adultos, grávidas, bebês em idade de 0 – 6 meses e 7 – 11 meses, crianças em idade de 1 – 3 anos, 4 – 6 anos e 7 – 10 anos (Brasil^d, 2005). Porém, não há valores para K, conforme **Tabela 3.2**. O Decreto n° 55871 de 26 de março de 1965, a Portaria n° 685 de 27 de agosto de 1998 e a Resolução RDC n° 42 de 29 de agosto de 2013, estabelecem limites máximos permitidos de concentrações de contaminantes inorgânicos tóxicos em bebidas não alcoólicas. Dos elementos estudados, somente o Cu possui valor estabelecido (30,0 mg kg⁻¹) (Brasil^e, 1965; Brasil^f, 1998; Brasil^g, 2013).

Tabela 3.1. Composição nutricional do caldo de cana de açúcar, de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

Composição	Valor
Umidade	81,7%
Energia	65 kcal
Proteína	Traço
Lipídeos	Traço
Carboidrato	18,2 g / 100 g
Fibra alimentar	0,1 g / 100 g
Ca	9 mg / 100 g
Mg	12 mg / 100 g
Mn	0,21 mg / 100 g
P	5 mg / 100 g
Fe	0,8 mg / 100 g
Na	Traço
K	18 mg / 100 g
Cu	0,01 mg / 100 g
Zn	0,1 mg / 100 g
Tiamina	Traço
Riboflavina	Traço
Piridoxina	0,3 mg / 100 g
Niacina	Traço
Vitamina C	2,8 mg / 100 g

Tabela 3.2. Ingestão diária recomendada (IDR) de Ca, Cu, Fe e Mg por indivíduo e grupo populacional.

Indivíduo / Grupo populacional	Ca (mg dia⁻¹)	Cu (µg dia⁻¹)	Fe (mg dia⁻¹)	Mg (mg dia⁻¹)
Adultos	1000	900	14	260
Bebês 0 – 6 meses	300	200	0,27	36
Bebês 7 – 11 meses	400	220	9	53
Crianças 1 – 3 anos	500	340	6	60
Crianças 4 – 6 anos	600	440	6	73
Crianças 7 – 10 anos	700	440	9	100
Gestantes	1200	1000	27	220
Lactantes	100	1300	15	270

Convencionalmente, as técnicas de espectrometria atômica têm sido empregadas para análises de amostras de alimentos, sendo necessário pré-tratamento para a completa destruição da matéria orgânica. Entretanto, a amostragem em suspensão oferece simplificação no preparo de amostras, baixo consumo de reagentes, minimiza os riscos de contaminação e perda de analitos oriundos do pré-tratamento da amostra (Amorim *et al.*, 2017; de Andrade *et al.*, 2018).

Procedimentos de preparo de amostra sob a forma de suspensão, proposta por Brady *et al.* (1974), empregando técnicas espectroanalíticas têm sido usados para a determinação de constituintes inorgânicos em diferentes amostras de alimentos. Tai *et al.* (2016) empregaram preparo de suspensão com a análise por injeção em fluxo (FIA) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor químico (FIA-CVG-ICP-MS) para a determinação de As, Hg e Pb em ervas. Amorim *et al.* (2017) aplicaram o preparo de suspensão com a detecção por espectrometria de

absorção atômica com chama (FAAS) para a determinação de Fe e Mg em amostras de mandioca. De Oliveira^b *et al.* (2017) empregaram suspensões para análise direta de Pb em leite cru por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS). De Andrade *et al.* (2018) usaram amostragem em suspensão para a determinação de Cd, Cr, Cu e Pb em amostras de iogurte por GF AAS.

Vários métodos analíticos têm sido empregados para determinar a composição e possíveis contaminantes em bebidas não alcoólicas (Daniel *et al.*, 2015; Jandrić & Cannavan, 2017; Ramasubramanian *et al.*, 2014; Szymczycha-Madeja *et al.*, 2014; Zuin *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2014).

Tormen *et al.* (2011) e Szymczycha-Madeja & Welna (2013) determinaram vários elementos em sucos de frutas por ICP-MS e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), respectivamente, após simples pré-tratamento, e compararam seus resultados com o procedimento de digestão via úmida. Eles perceberam que o simples procedimento de pré-tratamento era sensível para a determinação da composição inorgânica das amostras, uma vez que as concentrações foram consistentes com o procedimento de digestão.

Nogueira *et al.* (2009) determinaram minerais em caldo de cana. Nesse estudo, as amostras foram calcinadas e depois solubilizadas com solução de HNO₃ ou HCl. Foram determinados Ca, Cu, Mg, Mn e Zn por FAAS, e a concentração de P foi determinada por análise colorimétrica.

O advento das ferramentas quimiométricas tem melhorado o desenvolvimento ou otimização experimental, através da redução de custos e minimizando impactos ambientais causados pelos agentes químicos. Dados os múltiplos fatores envolvidos em um planejamento experimental simultâneo, como planejamento fatorial completo, é geralmente inviável experimentalmente por causa do grande número de experimentos, devido ao número de fatores,

tendo como alternativa o planejamento fatorial fracionário (Ferreira, 2015; Kumar *et al.*, 2014; Momen *et al.*, 2007; Novaes *et al.*, 2016). Com o planejamento fatorial fracionário, o número de experimentos pode ser reduzido à metade quando comparado com o planejamento fatorial completo, sem perder informações sobre o desempenho dos fatores no processo ou composição da resposta, fornecendo um planejamento experimental eficiente (Neto *et al.*, 2010; Reinholds *et al.*, 2015;).

Após a avaliação dos fatores e seu domínio experimental, ferramentas quimiométricas são aplicadas para gerar detalhes adicionais sobre o comportamento das variáveis. Por exemplo, a matriz Doehlert permite um planejamento envolvendo um número diferente de níveis e exibe alta eficiência em termos do número de experimentos necessários para a otimização (Ferreira, 2015; Teófilo & Ferreira, 2006).

Santos *et al.* (2014) aplicaram planejamentos fatorial e Doehlert para a otimização de um método analítico para determinar o teor de micronutrientes e minerais em leite de coco por ICP OES, após um simples procedimento de extração assistida por ultrassom. O procedimento foi validado por comparação com o método de digestão da amostra e mostrou-se ser simples, rápido e eficiente. Amorim *et al.* (2016) utilizaram o planejamento Box-Behnken para otimizar as condições de análise das amostras de amido na forma de suspensão para a determinação de Fe e Zn por FAAS. O procedimento também foi avaliado através da comparação com o método de digestão, possibilitando um preparo de amostras rápido, fácil e eficiente.

Considerando a importância da segurança de alimentos, este trabalho tem como objetivo otimizar um método analítico para a determinação multielementar simultânea de Ca, Cu, Fe, K e Mg em caldo de cana *in natura* usando amostragem em suspensão e detecção por ICP OES, após simples pré-tratamento.

3.2. Objetivos específicos

- Otimizar o preparo da amostra na forma de suspensão e das condições operacionais do espectrômetro através de planejamentos fatorial fracionário 2^{5-2} e Doehlert;
- Avaliar os parâmetros analíticos do método analítico proposto através da comparação dos métodos de suspensão e digestão das amostras, e de testes de adição e recuperação em três níveis de concentração;
- Aplicar o método analítico proposto em amostras de caldo de cana de açúcar *in natura*.
- Comparar as concentrações dos nutrientes obtidos em amostras de caldo de cana com valores de agências reguladoras e literatura.

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Instrumentação

As análises foram realizadas empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial (modelo ES-720, Varian, Mulgrave, Austrália) para a determinação simultânea multielementar de Ca, Cu, Fe, K e Mg em amostras de caldo de cana na forma de suspensão. As condições operacionais do espectrômetro estão na **Tabela 3.3**. Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Instituto Tecnológico de Pesquisa do Estado de Sergipe (ITPS), em Aracaju, Sergipe, onde o instrumento estava instalado.

Tabela 3.3. Características e condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente utilizado nas análises.

Parâmetro	Condição
Potência de radiofrequência (kW)	1,2
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão de introdução da amostra (mL min ⁻¹)	0,8
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,8
Tipo de nebulizador	V-groove
Câmara de nebulização	Sturman-Masters
Replicatas	3
Tempo de integração do sinal (s)	1,0
Comprimento de onda (nm)	Ca (II) 373,690 Cu (I) 324,350 Fe (II) 234,350 K (I) 766,491 Mg (I) 285,213 Mg (II) 280,265 Mg (II) 279,800

(I) Linha atômica / (II) Linha iônica

O procedimento de preparo da amostra na forma de suspensão foi realizado usando um banho ultrassônico (modelo Unique UltraCleaner 800A, Unique, São Paulo, Brasil) sob as condições otimizadas previamente através de um planejamento experimental simultâneo. Um bloco digestor com sistema fechado (modelo TE007A, TECNAL, São Paulo - SP, Brasil) foi utilizado para as digestões das amostras de caldo de cana como método comparativo.

3.3.2. Reagentes, soluções e amostras

Neste trabalho, todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As diluições foram realizadas usando água ultrapura com resistividade de 18,2 M Ω cm⁻¹ obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). As vidrarias utilizadas foram previamente descontaminadas por imersão em uma solução de HNO₃ 10% por 24 h e lavadas com água deionizada antes do uso.

A solução de ácido nítrico 65 % (m m⁻¹) de qualidade suprapura (HNO₃, Merck, Darmstadt, Alemanha), purificada usando um destilador *sub-boiling* equipado com tubo de quartzo (Kürner Analystechnik, Rosenheim, Alemanha) e a solução de peróxido de hidrogênio 30% (m m⁻¹) (H₂O₂, Merck, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados para o preparo das amostras na forma de suspensão e para digestão ácida das amostras em sistema fechado.

As soluções padrões para os testes de adição e recuperação foram preparadas por diluição adequada das soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de Ca, Cu, Fe, K e Mg (Titrisol, Merck, Darmstadt, Alemanha). As curvas de calibração externa também foram construídas empregando as soluções estoques, sendo diluídas de acordo com as faixas de trabalho requeridas.

Quatorze amostras de caldo de cana foram coletadas em comércios de rua na cidade de Aracaju, Sergipe, Nordeste, Brasil, no mesmo dia das análises em recipientes de plástico utilizados pelos comerciantes, em seguida, aplicadas para avaliar a metodologia proposta empregando a amostragem em suspensão.

3.3.3. Procedimentos de preparo das amostras

3.3.3.1. Preparo da amostra na forma de suspensão por simples diluição

As amostras na forma de suspensões foram preparadas utilizando 5,0 mL das amostras de caldo de cana *in natura*, imediatamente após a coleta e chegada ao laboratório, para evitar a degradação das mesmas. Essa alíquota

de amostra foi transferida para um tubo de centrífuga de 15 mL, seguido das adições dos volumes de 870 μL de HNO_3 (65% m m⁻¹), 700 μL de H_2O_2 (30% m m⁻¹), completando até o volume de 10 mL com água ultrapura. A mistura foi colocada em um banho ultrassônico à temperatura ambiente por 07 min e 40 s e analisadas diretamente por ICP OES. O preparo da amostra e o procedimento de análise foram otimizados utilizando os planejamentos fatorial fracionário e o Doehlert. As soluções do branco analítico foram preparadas da mesma maneira para controle dos reagentes, substituindo o volume de amostra de caldo de cana por água ultrapura (5,0 mL). As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.3.2. Digestão das amostras

Um volume de 5,0 mL das amostras de caldo de cana *in natura* foram transferidos para frascos de politetrafluoroetileno (PTFE) de 100 mL, adequados para digestão em bloco digestor em sistema fechado. Em seguida foram adicionados os volumes de 870 μL de HNO_3 (65% m m⁻¹), 700 μL de H_2O_2 (30% m m⁻¹) e completando o volume para 10 mL com água ultrapura. A mistura foi colocada no bloco digestor em sistema fechado a uma temperatura de 150 °C por 2h. Após a digestão, as amostras foram transferidas para tubos e ajustadas para um volume final de 15 mL com água ultrapura.

3.3.3.3. Planejamento experimental

Primeiramente, a otimização das análises diretas das suspensões por ICP OES foi realizada usando um planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻². As variáveis independentes foram: concentração de HNO_3 ($[\text{HNO}_3]$: 0,5 – 2,0 mol L⁻¹), volume de H_2O_2 ($V_{\text{H}_2\text{O}_2}$: 0,0 – 1,0 mL), tempo de sonicação (T_{sonic} : 0 – 20 min), vazão do gás de nebulização (VGN) e potência de radiofrequência (PRF:

1,2 – 1,4 kW). Em seguida, foi aplicado um planejamento Doehlert para as quatro variáveis mais significativas.

As razões das intensidades das linhas de emissão do magnésio iônico (Mg II 280,265 nm) e do magnésio atômico (Mg I 285,213 nm) foram utilizadas como resposta na avaliação dos planejamentos. Para estimar o erro experimental, foram realizadas replicatas do ponto central. Os experimentos foram realizados aleatoriamente. Os dados experimentais foram processados usando o software Statistica® versão 6.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Otimização da análise de amostra de caldo de cana na forma de suspensão

Uma amostra de caldo de cana *in natura* foi usada para avaliar a otimização do método de preparo da suspensão e introdução no sistema ICP OES. Inicialmente foi aplicado um planejamento fatorial fracionário em dois níveis. A **Tabela 3.4** mostra as combinações utilizadas para o planejamento fracionário 2^{5-2} com cinco variáveis: concentração de HNO₃ ([HNO₃]), volume de H₂O₂ (V_{H₂O₂}), tempo de sonicação (T_{sonic}), vazão do gás de nebulização (VGN) e potência de radiofrequência (PRF), com a eficiência do processo avaliada através da razão magnésio iônico / magnésio atômico (Mg II 280,265 nm / Mg I 285,213 nm), que tem sido um pré-requisito para avaliação para a condição de robustez do plasma (Mermet, 1991).

Tabela 3.4. Matriz para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} usado na otimização do processo.

Experimento	[HNO ₃] (mol L ⁻¹)	V _{H₂O₂} (mL)	T _{sonic} (min)	PRF (kW)	VGN (L min ⁻¹)	Razão (Mg II/Mg I)
1	(+1) 2,0	(+1) 1,0	(+1) 20	(+1) 1,4	(+1) 1,0	8,41
2	(+1) 2,0	(+1) 1,0	(-1) 0	(-1) 1,0	(+1) 1,0	7,10
3	(+1) 2,0	(-1) 0	(+1) 20	(-1) 1,0	(-1) 0,6	2,99
4	(+1) 2,0	(-1) 0	(-1) 0	(+1) 1,4	(-1) 0,6	3,92
5	(-1) 0,5	(+1) 1,0	(+1) 20	(-1) 1,0	(-1) 0,6	3,14
6	(-1) 0,5	(+1) 1,0	(-1) 0	(+1) 1,4	(-1) 0,6	4,23
7	(-1) 0,5	(-1) 0	(+1) 20	(+1) 1,4	(+1) 1,0	8,33
8	(-1) 0,5	(-1) 0	(-1) 0	(-1) 1,0	(+1) 1,0	6,98
9 (C)	(0) 1,25	(0) 0,5	(0) 10	(0) 1,2	(0) 0,8	6,42
10 (C)	(0) 1,25	(0) 0,5	(0) 10	(0) 1,2	(0) 0,8	6,54
11 (C)	(0) 1,25	(0) 0,5	(0) 10	(0) 1,2	(0) 0,8	6,45
12 (C)	(0) 1,25	(0) 0,5	(0) 10	(0) 1,2	(0) 0,8	6,45

() valores codificados; Mg II (280,265 nm); Mg I (285,213 nm); PRF: potência de radiofrequência; VGN: vazão do gás de nebulização.

Foi possível perceber que uma melhor resposta, com razão Mg II / Mg I ≥ 8 foi obtida para os experimentos 1 e 7, uma razão Mg II / Mg I ≥ 8 é considerada como condição de plasma robusto (Mermet, 1991). Os testes foram realizados para investigar quais fatores (variáveis) influenciaram o processo de análise direta da suspensão de caldo de cana.

Entretanto, já era esperado que a maioria dos experimentos poderiam não atingir um valor de razão ≥ 8 , porque o nebulizador V-Groove e a câmara de nebulização Sturman-Masters foram utilizadas para análise (Trevizan *et al.*, 2005; Sharp^a, 1988; Sharp^b, 1988).

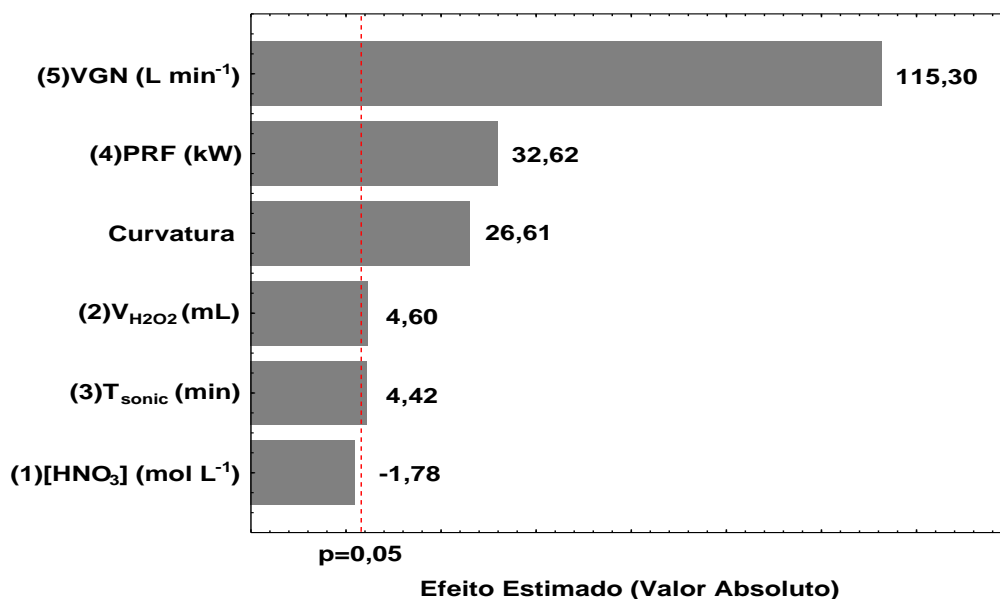
O nebulizador V-Groove tem sido ideal para a introdução de amostras com maior teor de sólidos dissolvidos, que abrange a forma de suspensão. Porém, sua geometria não é adequada para a geração de um aerossol homogêneo, apresentando uma distribuição irregular do tamanho da partícula e uma baixa eficiência. É recomendado aumentar a vazão de introdução da amostra para minimizar essa desvantagem. A câmara de nebulização Sturman-

Masters permite que partículas maiores sejam transportadas, formando aerossol com partículas maiores, comprometendo o processo de dessolvatação e afetando as linhas de emissão dos analitos, obtendo assim menores valores de intensidade, isto é, afetando a sensibilidade das linhas de emissão. Como o Mg é um elemento facilmente ionizável, a redução de sensibilidade é menos pronunciada, não comprometendo significativamente o sistema (Trevizan *et al.*, 2005; Sharp^a, 1988; Sharp^b, 1988).

Considerando uma resolução III para o planejamento fatorial fracionário proposto, o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} mostrou que o efeito da VGN (4,135) foi o maior contraste, seguido da PRF (1,170), conforme **Tabela 3.5**. Entretanto, foi possível perceber que o efeito do contraste para a interação entre $[\text{HNO}_3] * V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ e $T_{\text{sonic}} * \text{PRF}$ poderia ser confundido, uma vez que os valores dos contrastes são semelhantes ao da VGN. Porém, o efeito dos contrastes dos fatores principais foram maiores do que o efeito do contraste da interação.

No gráfico de Pareto (**Figura 3.1**), a magnitude dos contrastes foram representadas pelas colunas, onde a linha transversal indica a magnitude dos contrastes que são estatisticamente significativos a um nível de 95% de confiança.

Dentre os parâmetros avaliados, o gráfico de Pareto sugere que a VGN foi a variável mais significativa para o sistema proposto, seguida da PRF, $V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ e T_{sonic} , todos com efeitos positivos. Um maior valor de $V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ auxilia mais na regeneração do HNO_3 , e um T_{sonic} maior, proporciona uma maior eficiência de extração dos elementos químicos em estudo. A concentração de HNO_3 foi a variável que não apresentou contraste significativo para o nível de confiança de 95%.

Figura 3.1. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻².

A concentração de HNO₃ foi avaliada para verificar sua influencia na extração dos metais, mas ela não foi significativa porque em qualquer nível de concentração a extração foi semelhante. As variáveis que influenciam a razão Mg II / Mg I são a VGN e a PRF, que a níveis altos, 1,0 L min⁻¹ e 1,4 kW, respectivamente, forneceram respostas similares quando as concentrações de HNO₃ foram menores (0,5 mol L⁻¹) e maiores (2,0 mol L⁻¹), obtendo razões Mg II/ Mg I de 8,33 e 8,41, respectivamente, isto é, com os maiores valores para essas duas variáveis, uma maior quantidade de átomos e/ou íons são gerados, principalmente íons Mg, que foram avaliados no estudo de robustez do plasma (Mermet, 1991; Trevizan *et al.*, 2005). Portanto, a concentração de HNO₃ foi fixada em 1,25 mol L⁻¹ para os experimentos subsequentes, valor do ponto central.

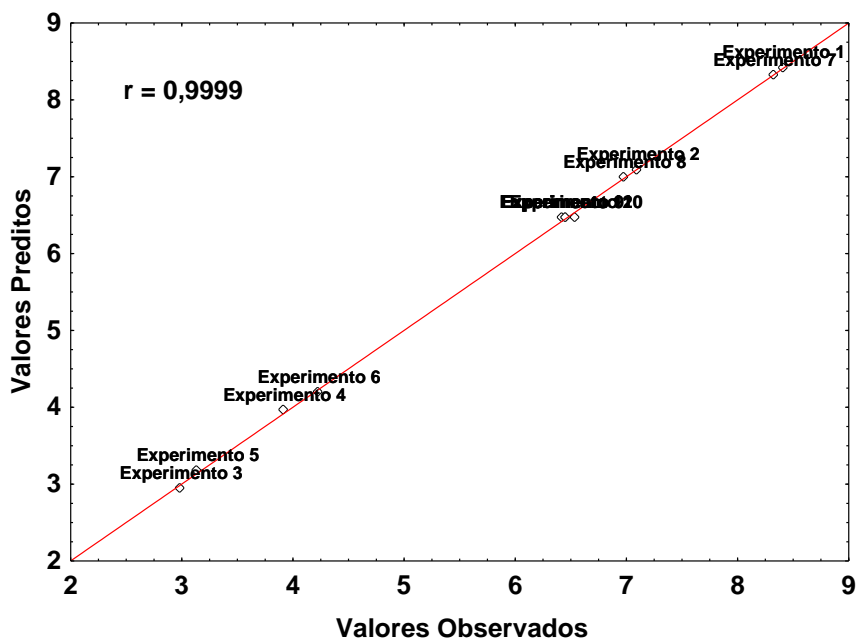
Tabela 3.5. Valores de contrastes e confundimentos para o planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻².

Parâmetro	Confundimento 1	Confundimento 2	Confundimento 3	Contrastes
[HNO ₃] (1)	2*5	2*3*4		-0,065
V _{H2O2} (2)	1*5	1*3*4		0,165
T _{sonic} (3)	4*5	1*2*4		0,160
PRF (4)	3*5	1*2*3		1,170
NGF (5)	1*2	3*4		4,135
[HNO ₃]*V _{H2O2}				4,135
[HNO ₃]*T _{sonic}	2*4	1*4*5	2*3*5	0,030
[HNO ₃]*PRF	2*3	1*3*5	2*4*5	-0,050
[HNO ₃]*NGF				0,165
V _{H2O2} *T _{sonic}				-0,050
V _{H2O2} *PRF				0,030
V _{H2O2} *NGF				-0,065
T _{sonic} *PRF				4,135
T _{sonic} *VGN				1,170
PRF*VGN				0,160
[HNO ₃]*V _{H2O2} *VGN	3*4*5			-1,655
T _{sonic} *PRF*VGN				-1,655
[HNO ₃]*V _{H2O2} *T _{sonic}				1,170
[HNO ₃]*V _{H2O2} *PRF				0,160
[HNO ₃]*T _{sonic} *PRF				0,165
[HNO ₃]*T _{sonic} *VGN				-0,050
[HNO ₃]*PRF*VGN				0,030
V _{H2O2} *T _{sonic} *PRF				-0,065

O teste de curvatura obteve resultado significativo para o planejamento fatorial 2^{5-2} , a partir das médias dos oito experimentos (M_{Exp}) e dos pontos centrais (M_{PC}), foi possível perceber que o M_{PC} ($6,47 \pm 0,08$) foi maior do que a M_{Exp} ($5,64 \pm 1,92$), indicando que não houve uma curvatura, significando que não existe uma condição de máximo ou mínimo na região central do domínio experimental estudado (**Tabela 3.4**) (Ferreira, 2015).

Para melhor representar o que foi observado na metodologia proposta, foi realizada uma análise de regressão linear da razão Mg II / Mg I, para os valores preditos *versus* valores observados (**Figura 3.2**). Foi possível obter uma equação da reta $y = (1,0001 \pm 0,0102)x + (0,0012 \pm 0,0631)$ com um valor de inclinação e um coeficiente de correlação ($r = 0,9999$) próximos ao valor ideal ($a = r = 1,0$) e um intercepto próximo a zero ($b = 0$), um bom indicador da boa exatidão e precisão dos dados gerados (Ferreira, 2015).

Figura 3.2. Análise de regressão linear para os valores preditos versus os valores observados para a razão Mg II / Mg I obtida a partir do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} .



Após a avaliação do planejamento experimental, foi proposto um planejamento Doehlert para as variáveis significativas: $V_{H_2O_2}$, T_{sonic} , V_{GN} e

PRF, como mostrado na **Tabela 3.6** (Ferreira, 2015; Teófilo & Ferreira, 2006). O planejamento foi avaliado através da razão Mg II / Mg I, e também através do conceito de múltipla resposta (MR), calculada através das razões Mg II / Mg I obtidas através da amostra em suspensão e de uma solução multielementar.

Tabela 3.6. Matriz do Planejamento Doehlert para as quatro variáveis: vazão do gás de nebulização (VGN), volume de peróxido de hidrogênio ($V_{H_2O_2}$), tempo de sonicação (T_{sonic}) e potência de radiofrequência (PRF).

Valores codificados / reais					Respostas = razão (Mg II / Mg I)		
Experimento	VGN (L min ⁻¹)	$V_{H_2O_2}$ (mL)	T_{sonic} (min)	PRF (W)	Solução da amostra digerida	Solução padrão	MR
1	0 / 0,8	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	6,05	5,27	1,557
2	1 / 1,0	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	7,18	6,15	1,833
3	0,5 / 0,9	0,866 / 1,0	0 / 10	0 / 1200	7,20	6,25	1,849
4	0,5 / 0,9	0,289 / 0,67	0,817 / 20	0 / 1200	7,74	6,80	2,000
5	0,5 / 0,9	0,289 / 0,67	0,204 / 12,5	0,791 / 1400	7,08	6,13	1,816
6	-1 / 0,6	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	2,25	2,86	0,711
7	-0,5 / 0,7	-0,866 / 0,0	0 / 10	0 / 1200	4,45	3,98	1,160
8	-0,5 / 0,7	-0,289 / 0,33	-0,817 / 0	0 / 1200	4,40	4,00	1,157
9	-0,5 / 0,7	-0,289 / 0,33	-0,204 / 7,5	-0,791 / 1000	3,71	3,36	0,974

Tabela 3.6. (Continuação).

Valores codificados / reais				Respostas = razão (Mg II / Mg I)			
Experimento	VGN (L min ⁻¹)	V _{H2O2} (mL)	T _{sonic} (min)	PRF (W)	Solução da amostra digerida	Solução padrão	MR
10	0,5 / 0,9	-0,866 / 0,0	0 / 10	0 / 1200	2,26	2,77	0,700
11	0,5 / 0,9	-0,289 / 0,33	-0,817 / 0	0 / 1200	7,17	6,10	1,824
12	0,5 / 0,9	-0,289 / 0,33	-0,204 / 7,5	-0,791 / 1000	6,47	5,52	1,648
13	-0,5 / 0,7	0,866 / 1,00	0 / 10	0 / 1200	4,36	3,93	1,141
14	0 / 0,8	0,577 / 0,83	-0,817 / 0	0 / 1200	6,02	5,25	1,550
15	0 / 0,8	0,577 / 0,83	-0,204 / 7,5	-0,791 / 1000	5,29	4,48	1,343
16	-0,5 / 0,7	0,289 / 0,67	0,817 / 20	0 / 1200	7,15	6,10	1,821
17	0 / 0,8	-0,517 / 0,17	0,817 / 20	0 / 1200	6,03	5,12	1,533
18	0 / 0,8	0 / 0,50	0,613 / 17,5	-0,791 / 1000	5,19	4,34	1,309

Tabela 3.6. (Continuação).

Valores codificados / reais				Respostas = razão (Mg II / Mg I)			
Experimento	VGN (L min ⁻¹)	V _{H2O2} (mL)	T _{sonic} (min)	PRF (W)	Solução da amostra digerida	Solução padrão	MR
19	-0,5 / 0,7	0,289 / 0,67	0,204 / 12,5	0,791 / 1400	4,85	4,49	1,286
20	0 / 0,8	-0,577 / 0,17	0,204 / 12,5	0,791 / 1400	6,54	5,61	1,670
21	0 / 0,8	0 / 0,50	-0,613 / 2,5	0,791 / 1400	6,45	5,67	1,666
22	0 / 0,8	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	6,14	5,14	1,549
23	0 / 0,8	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	5,99	5,12	1,526
24	0 / 0,8	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	5,93	5,08	1,512
25	0 / 0,8	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	5,97	5,18	1,533
26	0 / 0,8	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	5,96	5,08	1,518
27	0 / 0,8	0 / 0,50	0 / 10	0 / 1200	5,77	5,17	1,505

A resposta múltipla tem sido necessária na otimização multivariada de sistemas analíticos que envolvem muitas respostas (variáveis dependentes) porque permite a otimização de sistemas com uma condição satisfatória para todas as variáveis dependentes (amostra em suspensão e solução multielementar), e tem sido utilizada por muitos pesquisadores em uma ampla gama de sistemas (Ferreira, 2015; Novaes *et al.*, 2016). Os valores codificados obtidos para a matriz Doehlert foram calculados através da **Equação 3.1**.

$$X_i = \left(\frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right) \times \beta d \quad \text{Eq. 3.1.}$$

em que, X_i é o valor codificado, Z_i é o valor experimental, Z_i^0 é o valor experimental no ponto central, βd é o maior valor codificado e ΔZ_i é a diferença entre o valor do ponto central e o valor máximo ou mínimo (Ferreira, 2015).

A múltipla resposta (MR) foi calculada através das razões Mg II / Mg I obtidas nas análises da amostra em suspensão e da solução multielementar, conforme **Equação 3.2**.

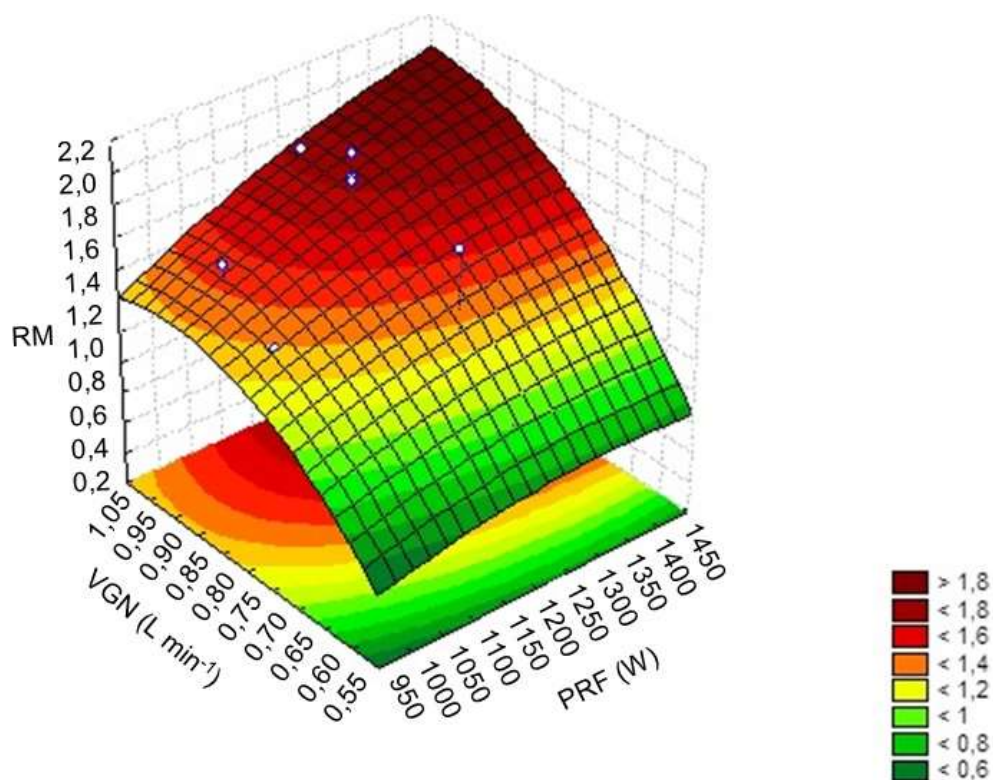
$$MR = [(Mg \text{ II}/Mg \text{ I})/(Mg \text{ II}/Mg \text{ I})_{\text{máx}}]_{\text{amostra em suspensão}} + [(Mg \text{ II}/Mg \text{ I})/(Mg \text{ II}/Mg \text{ I})_{\text{máx}}]_{\text{solução multielementar}} \quad \text{Eq. 3.2.}$$

em que, (Mg II / Mg I) foi o valor da relação entre as intensidades das linhas de emissão [Mg II 280,265 nm e Mg I 285,208 nm] e $(Mg \text{ II} / Mg \text{ I})_{\text{máx}}$ foi o valor máximo da relação entre as linhas de emissão do magnésio para a amostra em suspensão (7,74) e a solução multielementar (6,80).

O planejamento Doehlert consistiu de 21 experimentos e seis replicatas do ponto central para VGN, $V_{H_2O_2}$, T_{sonic} e PRF. Os melhores resultados foram obtidos para os experimentos 2, 3, 4, 5 e 16. É importante notar que em um planejamento Doehlert os fatores avaliados tendem a serem arranjados em ordem crescente de significância. Entretanto, no sistema proposto, a PRF tornou-se a última coluna de avaliação por que o instrumento a ser otimizado não permitia a manipulação da potência em muitos níveis. Os resultados foram

expressos como uma superfície gerada por uma função matemática, como mostrado na **Figura 3.3**.

Figura 3.3. Superfície de resposta gerada para o planejamento Doehlert proposto, para as variáveis vazão do gás de nebulização (VGN) e potência de radiofrequência (PRF), através da múltipla resposta (MR).

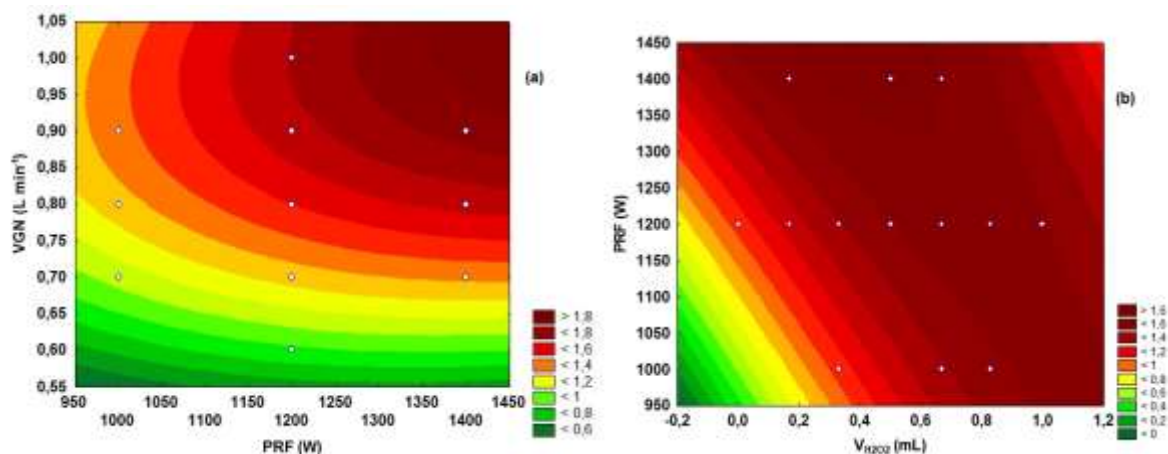


A superfície gerada mostrou que a VGN, quando ajustada para 1,0 L min⁻¹, e com uma PRF de 1200 W, é suficiente para fornecer uma resposta satisfatória. Foi possível observar que um aumento na PRF para 1400 W melhora a resposta, porém, tais condições extremas aceleram o desgaste instrumental e, portanto, não seria viável a sua aplicação. Para melhor visualização, foram gerados gráficos de contorno, conforme **Figuras 3.4.(a)** e **(b)**.

Conforme a discussão da superfície de resposta, a **Figura 3.4.(a)** mostrou que o uso de uma PRF com um valor do ponto central (1200 W) ou acima, junto com uma VGN de 1,0 L min⁻¹, foi uma condição ótima para as análises das amostras de caldo de cana de açúcar na forma de suspensão. E

na **Figura 3.4.(b)**, foi possível observar que mantendo a PRF no valor do ponto central e usando um $V_{H_2O_2}$ de 0,7 mL, foi suficiente para obter respostas ótimas para o procedimento proposto.

Figura 3.4. Gráficos de contorno obtidos para o planejamento Doehlert **(a)** VGN *versus* PRF e **(b)** PRF *versus* $V_{H_2O_2}$.



O modelo quadrático foi avaliado através da regressão linear, com uma equação da reta de $y = (0,8828 \pm 0,1325)x + 0,1722 \pm 0,1995$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,94. Como os coeficientes angular e linear contemplam os valores 1 e 0, respectivamente, e o r ($0,94$) $> 0,90$, mostrando um ajuste entre os valores obtidos experimentalmente e os valores preditos (Ferreira, 2015). O modelo quadrático obtido mostrou-se adequado para as condições estudadas.

A equação utilizada para o cálculo dos valores reais para o planejamento Doehlert, **Equação 3.1.**, foi aplicada para os valores críticos, fornecendo uma estimativa para os valores reais utilizados como valores ótimos nas condições experimentais para a análise direta das amostras de caldo de cana de açúcar na forma de suspensão: 0,70 mL de H_2O_2 , 7 min e 40 s de tempo de sonicação à temperatura ambiente, $1,0 \text{ L min}^{-1}$ de VGN e 1200W de PRF. A concentração de HNO_3 foi $1,25 \text{ mol L}^{-1}$, valor fixado após o planejamento fatorial 2^{5-2} .

3.4.2. Parâmetros analíticos do método proposto

3.4.2.1. Limites de detecção e de quantificação

Para as análises diretas das amostras na forma de suspensão por ICP OES foram utilizadas curvas de calibração externa em meio de HNO₃ 2,0 mol L⁻¹. Os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) foram calculados usando a concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) e a razão sinal / ruído (SBR), de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), conforme equações 2.3 a 2.6. Nos cálculos dos LoD e LoQ, RSD_{branco} é o desvio padrão relativo das medidas das intensidades de emissão de 10 soluções branco nos comprimentos de onda selecionados (IUPAC, 1978). OS valores de LoD e Loq estão mostrados na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7. Valores de limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) obtidos para os métodos de amostragem na forma de suspensão e digestão.

Elemento	Amostragem na forma de suspensão		Digestão	
	LoD (mg L ⁻¹)	LoQ (mg L ⁻¹)	LoD (mg L ⁻¹)	LoQ (mg L ⁻¹)
Ca	2,0	6,7	2,0	6,7
Cu	0,04	0,13	0,04	0,13
Fe	0,20	0,70	0,25	0,83
K	1,0	3,3	11,0	36,6
Mg	1,5	4,9	2,5	8,3

Os LoD e LoQ foram compatíveis com os valores obtidos na literatura para análises usando o nebulizador V-Groove e a câmara de nebulização Sturman-Masters (Trevizan *et al.*, 2005; Sharp^a, 1988; Sharp^b, 1988).

3.4.2.2. Exatidão e precisão

Para validar a metodologia proposta, foi realizada uma comparação de métodos utilizando a amostra 4, considerando a digestão ácida no bloco digestor em sistema fechado como um método alternativo em relação ao método de amostragem em suspensão para análise direta de amostras de

caldo de cana de açúcar. Os resultados para Ca, Cu, Fe, K e Mg, bem como as concordâncias, estão mostrados na **Tabela 3.8**.

A concordância entre os valores encontrados na digestão da amostra 4 em relação às concentrações obtidas pela análise da amostra de caldo de cana na forma de suspensão, variaram de $94,0 \pm 1,4\%$ (Cu) a $99,0 \pm 1,2\%$ (Ca). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (RSD%), foi menor do que 1,4% ($n = 3$). O simples pré-tratamento seguido pela análise por ICP OES mostrou valores de precisão e exatidão aceitáveis para análises químicas quantitativas (Tormen *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2017).

Tabela 3.8. Resultados obtidos de concordância e desvio padrão relativo (RSD) por comparação de métodos, e avaliação usando testes de adição e recuperação para as análises de caldo de cana (amostra 4) por ICP OES.

	Ca	Cu	Fe	K	Mg
Suspensão / Método proposto (mg L ⁻¹)	112,5 ± 1,4	1,164 ± 0,017	14,56 ± 0,21	611 ± 7	112,7 ± 0,5
RSD (%)	1,3	1,3	1,4	1,2	0,4
Digestão / Método comparativo (mg L ⁻¹)	113,6 ± 3,9	1,238 ± 0,088	15,40 ± 0,64	646 ± 19	119,4 ± 3,9
RSD (%)	3,4	7,2	4,1	2,9	3,2
Concordância (%)	99,0 ± 1,2	94,0 ± 1,4	94,5 ± 1,4	94,6 ± 1,1	94,4 ± 0,4

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

3.4.3. Aplicação do método otimizado em amostras de caldo de cana *in natura* após simples diluição

O método analítico otimizado foi aplicado para quatorze amostras de caldo de cana *in natura*, coletadas em comércio de rua na cidade de Aracaju, Sergipe, Nordeste, Brasil. As amostras preparadas na forma de suspensões foram analisadas por ICP OES e as concentrações encontradas de Ca, Cu, Fe, K e Mg estão mostradas na **Tabela 3.9**.

Os resultados para as análises das amostras de caldo de cana na cidade de Aracaju mostraram que os nutrientes Ca, Cu, Fe, K e Mg têm concentrações médias (\pm desvio padrão, em mg L⁻¹) de 108 ± 55 , $0,506 \pm 0,357$, $6,40 \pm 3,49$, 470 ± 230 e 114 ± 54 , respectivamente. As concentrações variaram de $20,6 \pm 2,4$ a 198 ± 12 mg L⁻¹ (Ca); $<0,13$ a $1,160 \pm 0,020$ mg L⁻¹ (Cu); $2,69 \pm 0,05$ a $14,6 \pm 0,21$ mg L⁻¹ (Fe); 143 ± 5 a 836 ± 21 mg L⁻¹ (K) e $55,4 \pm 5,7$ a 229 ± 6 mg L⁻¹ (Mg).

Entre os elementos avaliados, somente Cu tem valores de limites máximos regulamentados pela ANVISA (máximo de 30,0 mg kg⁻¹ para frutas e xarope natural). Em nosso estudo, as concentrações de Cu nas amostras de caldo de cana variaram entre $<0,130$ e $0,661 \pm 0,011$ mg L⁻¹, menores do que o valor de concentração máxima vigente. Cálcio, Fe, K e Mg não são regulamentados pela legislação Brasileira (Brasil^e, 1965; Brasil^f, 1998; Brasil^g, 2013). Comparando Ca, Cu, Fe e Mg com o valor de IDR recomendado para adultos, assumindo um volume de 200 mL de caldo de cana de açúcar, foi possível perceber que correspondem a 2,16; 11,3; 9,14 e 8,77% da IDR recomendada.

Tabela 3.9. Concentrações de Ca, Cu, Fe, K e Mg obtidas em amostras de caldo de cana na forma de suspensão por ICP OES, após um simples pré-tratamento.

Amostra	Ca (mg L ⁻¹)	Cu (mg L ⁻¹)	Fe (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Mg (mg L ⁻¹)
1	173 ± 7	< 0,130	5,58 ± 0,21	836 ± 21	119 ± 4
2	62 ± 4	0,21 ± 0,01	9,45 ± 0,53	686 ± 32	121 ± 8
3	51 ± 6	0,29 ± 0,03	2,92 ± 0,29	293 ± 21	84 ± 6
4	112 ± 1	1,16 ± 0,02	15 ± 0,2	611 ± 7	113 ± 1
5	144 ± 6	0,66 ± 0,01	5,76 ± 0,16	700 ± 39	154 ± 6
6	107 ± 5	< 0,130	3,45 ± 0,12	526 ± 24	125 ± 6
7	118 ± 4	< 0,130	9,91 ± 0,49	156 ± 7	217 ± 9
8	114 ± 10	< 0,130	7,84 ± 0,83	574 ± 45	57 ± 5
9	186 ± 10	< 0,130	6,34 ± 0,39	143 ± 5	71 ± 4,2
10	119 ± 2	0,42 ± 0,01	3,25 ± 0,14	157 ± 3	229 ± 6

Tabela 3.9. (Continuação).

Amostra	Ca (mg L ⁻¹)	Cu (mg L ⁻¹)	Fe (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Mg (mg L ⁻¹)
11	54 ± 5	< 0,130	9,54 ± 0,54	556 ± 33	55 ± 6
12	198 ± 12	0,30 ± 0,02	5,07 ± 0,35	458 ± 23	95 ± 6
13	21 ± 2	< 0,130	2,69 ± 0,05	242 ± 9	71 ± 3
14	48 ± 3	< 0,130	3,17 ± 0,37	638 ± 43	80 ± 6
Média	108	0,51	6,43	470	114
Desvio padrão	55	0,36	3,49	230	54
Mínimo	21	0,21	2,69	143	55
Máximo	198	1,16	15	836	229
n	14	6	14	14	14

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Considerando a massa do volume de amostra utilizado (5 mL) como 5,37 g, foi possível comparar as concentrações médias obtidas neste estudo com as reportadas na tabela TACO. Para Ca, Cu e K os valores estavam 1,1; 4,8 e 2,4, respectivamente, acima e para Fe e Mg, estavam 1,3 e 1,1, respectivamente, abaixo dos valores da TACO (TACO, 2011), conforme **Tabela 3.10**.

Tabela 3.10. Comparação das concentrações médias obtidas nas amostras de caldo de cana com os valores reportados pela tabela TACO.

Elemento	Valor da TACO	Valor obtido neste estudo
Ca / mg kg ⁻¹	90	100
Cu / mg kg ⁻¹	0,10	0,48
Fe / mg kg ⁻¹	8	6
K / mg kg ⁻¹	180	437
Mg / mg kg ⁻¹	120	106

3.5. Considerações finais

O planejamento fatorial fracionário permitiu avaliar que o volume de peróxido de hidrogênio, tempo de sonicação, vazão do gás de nebulização e potência de radiofrequência afetaram o método de pré-tratamento e a análise direta da amostra de caldo de cana de açúcar na forma de suspensão por ICP OES. Posteriormente, usando um planejamento Doehlert, foi possível descrever o comportamento do sistema e definir as condições experimentais ótimas.

O método de amostragem em suspensão produziu resultados confiáveis quando comparados ao método de digestão ácida usando bloco digestor em sistema fechado. Baseados em nossos estudos, foi proposto que este novo método, através do simples pré-tratamento da amostra preparada na forma de suspensão e análise por ICP OES, sendo considerado simples de executar, rápido, viável, preciso e exato e pode ser usado como alternativa para análises

de rotina de amostras de caldo de cana de açúcar para determinação de Ca, Cu, Fe, K e Mg.

Em nossos estudos, somente as concentrações de Cu foram avaliadas de acordo com a ANVISA, sendo que em todas as amostras de caldo de cana *in natura*, suas concentrações estavam abaixo do limite máximo permitido (30 mg kg⁻¹). Cálcio, Fe, K e Mg não foram avaliados, porque não possuem limites máximos permitidos pela legislação brasileira da ANVISA. Cálcio, Cu, Fe e Mg corresponderam a 2,16; 11,3; 9,14 e 8,77% da IDR.

Capítulo 4. Análise de especiação química de As, Sb e Se inorgânicos em frutos secos utilizando MSFIA-HG-AFS

4.1. Introdução

Os frutos secos são frequentemente consumidos em todo o mundo, dentre eles estão o preparo de avelã (*Corylus avellana* L.) (Yuan *et al.*, 2018), amêndoa (*Prunus amygdalus dulcis*) (Yada *et al.*, 2011), pistacho (*Pistacia vera* L.) (Rabadán *et al.*, 2018), castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) (Moreira *et al.*, 2019), castanha (*Castanea sativa* Miller) (Echegaray *et al.*, 2018) e amendoim (*Arachis hipogea* L.) (de Santana *et al.*, 2016), sob as mais variadas formas, com ou sem pele, natural ou tostada, com ou sem sal, dentre outras. Estes alimentos têm se tornado uma importante fonte nutricional para a obtenção de carboidratos, antioxidantes, vitaminas e minerais, além de contribuir para a redução dos riscos de algumas doenças (Sauder *et al.*, 2015; Asghari *et al.*, 2017; Jeszka-Skowron *et al.*, 2017).

Entretanto, em matrizes de alimentos pode ocorrer a presença de contaminantes oriundos do uso de fertilizantes, solo, água, dentre outros, que muitas vezes acrescentam elementos classificados potencialmente tóxicos, tais como As, Cd, Pb e Hg (Souza *et al.*, 2014; Kibblewhite, 2018; Saha & Rahman, 2018). Desta maneira, torna-se necessário um maior controle de qualidade desses alimentos, no intuito de evitar a presença de elementos tóxicos nos mesmos. Por exemplo, Parekh *et al.*, 2008 determinaram Se em castanhas oriundas do Brasil, Bolívia, Peru e América do Norte. De Santana *et al.*, 2016 encontraram em amostras de amendoim do Brasil, concentrações de As, Sb e Se. Sigrist *et al.*, 2016 quantificaram As em amostras de carnes de boi, frango e peixe, leite bovino, queijo, ovo, arroz, farinhas de trigo e milho, lentilha, soja, batata, dentre outros.

Porém, para avaliar o potencial de toxicidade do elemento químico presente na matriz, torna-se necessária a utilização de métodos analíticos que possibilitem a realização da análise de especiação química em amostras de

alimentos, devido à influência no grau de toxicidade que é exercida pelo estado de oxidação no qual o elemento químico se encontra.

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), os níveis de As orgânico e inorgânico em produtos agrícolas geralmente são menores do que 250 ng g⁻¹, dependendo das condições de cultivo. A IARC classifica o elemento químico As como carcinogênico para os humanos (grupo 1), sendo que dentre os compostos inorgânicos de As, as espécies trivalentes são mais tóxicas e bioativas do que as espécies pentavalentes, por penetrarem mais facilmente entre as células. Segundo a Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR), o As está classificado na posição 1 na lista de substâncias tóxicas prioritárias de 2017. O contato com compostos inorgânicos de As pode afetar a pele, fígado, e os sistemas digestivo, neurológico e respiratório, dentre outros órgãos (IARC, 2012; ATSDR^a, 2017; ATSDR, 2019).

A IARC não possui classificação para exposição com o elemento químico Sb. Por outro lado, a ATSDR, o classifica na posição 244 da lista de substâncias tóxicas prioritárias. Com relação às substâncias inorgânicas do Sb, as formas trivalentes também são mais tóxicas do que as formas pentavalentes. Em seres humanos, substância com antimônio afeta os sistemas cardiovascular e respiratório, dentre outros (ATSDR^a, 2017; ATSDR^b, 2017).

Por sua vez, o selênio, segundo a IARC, é classificado como carcinogênico para os humanos, e a ATSDR o classifica na posição 146 do ranking de substâncias tóxicas prioritárias. Sendo que as espécies inorgânicas são mais tóxicas do que as espécies orgânicas. A presença de Se tem sido associada à redução de doenças cardiovasculares, e sua deficiência pode causar danos irreversíveis ao sistema nervoso, surgimento de problemas gastrointestinais e da tireóide, dentre outros. Porém, é tóxico em níveis elevados, causando náuseas, vômitos, perda de cabelo, fadiga, dentre outros sintomas (ATSDR, 2003; Kumar & Priyadarsini, 2014; Sun *et al.*, 2014; ATSDR^a, 2017).

Para realizar a análise de especiação química de As, Sb e Se em amostras de alimentos, a literatura reporta a utilização de diversas técnicas: Huber *et al.* (2017) avaliaram as concentrações de Se inorgânico, monometilarsinato (MMA), dimetilarsinato (DMA) e As total em amostras de alimentos para bebês utilizando as técnicas de espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos após armadilha criogênica (HG-CT-AAS) e ICP-MS. Tuzen & Pekiner (2015) determinaram as concentrações de Se total e das espécies Se(IV) e Se(VI) em amostras de chá gelado, soda e água mineral utilizando GF AAS. Pérez *et al.* (2018) utilizaram as técnicas de espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS) e cromatografia por troca iônica (AEC) acoplada à técnica de ICP-MS para a análise de especiação química de Se(IV), Se(VI), Se total e selenoaminoácidos em amostras de alho (*Allium sativum* L.).

A hifenação para a análise de especiação química em amostras de alimentos pode ser realizada através da análise por injeção em fluxo multiseriada (MSFIA), que vem sendo acoplada a detecção por espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (CV-AFS) (da Silva *et al.*, 2013) e HG-AFS (de Santana *et al.*, 2016), para a determinação das espécies totais dos elementos traço presentes nestes tipos de matrizes, possibilitando a quantificação na ordem de ng L⁻¹. A hifenação de MSFIA-HG-AFS possibilita também um baixo consumo de amostra e reagentes, além da determinação de elementos traço com alta sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade oferecidas pelos sistemas automatizados, para elementos químicos que formam hidretos, tais como As, Sb e Se (Cerdà *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019).

Para a otimização de métodos analíticos utilizando o sistema MSFIA, a literatura reporta a aplicação de planejamentos experimentais simultâneos, tais como planejamento fatorial completo de três níveis (De Santana *et al.*, 2016; Junior *et al.*, 2017) e Box-Behnken (Portugal *et al.*, 2015) para otimizar as condições do sistema.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a análise de especiação química de As, Sb e Se em amostras de frutos secos empregando o sistema MSFIA acoplado à detecção por HG-AFS, após otimização das condições experimentais utilizando planejamento Doehlert.

Este trabalho foi realizado na Universidade das Ilhas Baleares, Palma de Mallorca, Espanha, com o auxílio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob processo nº 88881.189612/2018-01, no período de 09/2018 a 02/2019, sob a supervisão do Professor Dr. Víctor Martín Cerdà.

4.2. Objetivos específicos

- Otimizar as condições de geração de hidretos através de planejamentos Doehlert;
- Estabelecer um método analítico para especiação química de As, Sb e Se inorgânicos em amostras de frutas secas;
- Avaliar a exatidão e precisão dos métodos analíticos através da utilização de material de referência certificado e de testes de adição e recuperação em três níveis de concentração;
- Aplicar os métodos otimizados em amostras de frutos secos.
- Avaliação das concentrações de As, Sb e Se inorgânicos nas amostras de frutas secas conforme a legislação vigente.

4.3. Procedimento experimental

4.3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água ultrapura utilizada foi obtida a partir de um sistema Millipore (Bedford, EUA) com

resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. As soluções de ácido nítrico 65% (m m^{-1}) e o peróxido de hidrogênio 30% (m m^{-1}) foram obtidos da Sharlau, Espanha.

As soluções estoque de As(III) e As(V) com concentrações de 1000 mg L^{-1} foram obtidas a partir da dissolução de óxido de arsênio (III) (As_2O_3 , Sigma-Aldrich, Espanha) e arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Panreac, Espanha) em uma solução de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

As soluções estoque de Sb(III) e Sb(V) com concentrações de 1000 mg L^{-1} foram obtidas a partir da dissolução de tartarato de antimônio e potássio ($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba, Itália) e ácido piroantimoniato de potássio e antimônio ($\text{H}_2\text{K}_2\text{O}_7\text{Sb}_2$, Carlo Erba, Itália) em HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. As soluções estoque de Se(IV) e Se(VI) com concentrações de 1000 mg L^{-1} foram obtidas a partir da dissolução de selenito de sódio (NaSeO_3 , Sharlau, Espanha) e selenato de sódio (Na_2SeO_4 , Scharlau, Espanha), respectivamente, em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções de borohidreto de sódio $0,6 \%$ (m v^{-1}) (NaBH_4 , Scharlau, Espanha) foram preparadas diariamente com acréscimo de hidróxido de sódio $0,05\%$ (m v^{-1}) (Scharlau, Espanha) para um volume de 100 mL. As soluções de iodeto de potássio $12,5 \%$ (m v^{-1}) (KI, Scharlau, Espanha) foram preparadas diariamente em 2,0 g de L-ácido ascórbico (Scharlau, Espanha), para um volume de 100 mL. A solução de HCl $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ (Scharlau, Espanha) foi preparada utilizando um volume de 43,5 mL do HCl 37% (m m^{-1}), para um volume final de 150 mL.

Todas as vidrarias utilizadas nos experimentos foram previamente descontaminadas em banho de HNO_3 10% (v v^{-1}) por 24 h, sendo posteriormente lavadas com água deionizada, e postas para secar à temperatura ambiente.

4.3.2. Coleta e pré tratamento das amostras de frutos secos

Nove amostras comerciais de frutos secos (avelã, amêndoa, pistache, castanha de caju e mistura de frutos secos) foram adquiridas em supermercados da cidade de Palma de Mallorca, Ilhas Baleares, Espanha. No

laboratório, as amostras foram moídas manualmente em almofariz e pistilo, e postas para secar a 50 °C por 72 h, em seguida, foram moídas em um moinho IKA® M20 para a obtenção de um tamanho de partícula adequado ($\leq 150 \mu\text{m}$), e mantidas em dessecador até o momento da decomposição assistida por micro-ondas.

O procedimento de mineralização das amostras foi realizado com base em trabalhos publicados na literatura com matrizes de alimentos (da Silva *et al.*, 2013; de Santana *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2017). A digestão foi realizada medindo uma massa de $0,2000 \pm 0,0001$ g de amostra (em triplicata), sendo acrescida de uma mistura de 1,50 mL de HNO_3 65% (m m^{-1}), 0,70 mL de H_2O_2 30% (m m^{-1}) e 7,80 mL de água ultrapura.

As misturas foram mantidas em repouso por 20 minutos para a realização de uma etapa de pré-digestão, em seguida, levadas ao forno micro-ondas (Multiwave GO, Áustria) e submetidas ao programa de aquecimento mostrado na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1. Programa de temperatura do micro-ondas para digestão das amostras de frutos secos.

Etapa	Rampa (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1 (aquecimento)	5	100	3
2 (aquecimento)	2	140	15
3 (resfriamento)	---	---	10

Após o resfriamento, as soluções com as amostras decompostas foram transferidas para tubos de centrifuga e avolumadas para 15 mL com água ultrapura e armazenadas para posterior análise. O mesmo procedimento foi aplicado aos materiais de referência certificados e às soluções dos brancos analíticos. Para as determinações de Se total, as amostras foram submetidas a um aquecimento a 80 ± 5 °C por 20 min, antes de serem analisadas.

4.3.3. Sistema MSFIA acoplado à detecção por HG-AFS

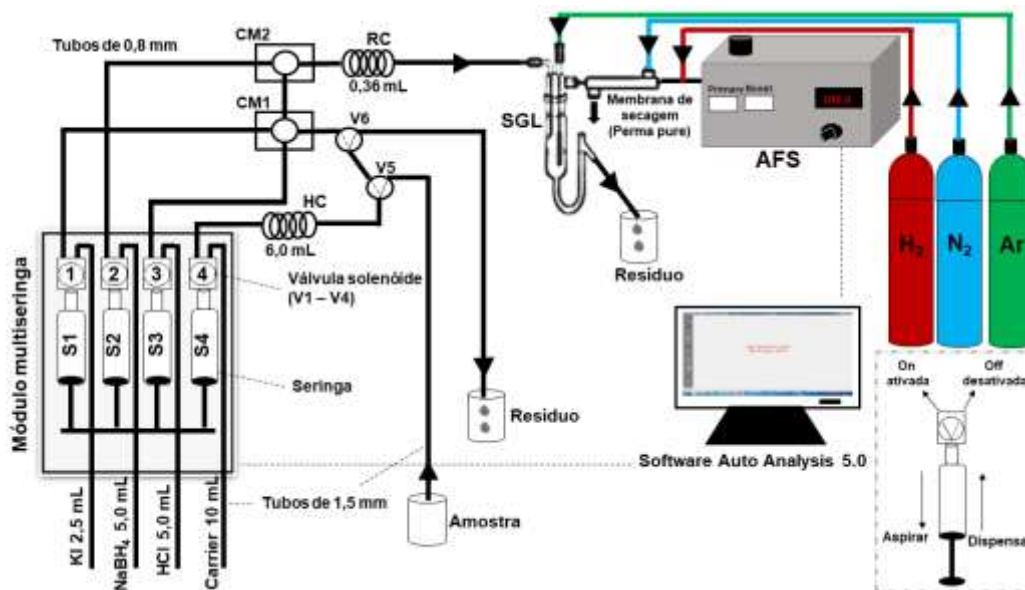
A **Figura 4.1** mostra esquematicamente o sistema MSFIA-HG-AFS. O sistema era composto de um módulo de bureta multisinga com velocidades programáveis (Multiburette 4S, Crison, Barcelona, Espanha) para aspirar ou dispensar líquidos. Este módulo permite mover simultaneamente as quatro seringas (S1 – S4) com o auxílio do mesmo motor. Quatro válvulas solenóides de três vias (V1 – V4, N-Research, Caldwell, New Jersey, EUA) foram conectadas para controlar a direção que os líquidos deveriam seguir, preencher as seringas ou dispensar para o sistema.

Uma bobina de carga (HC) para carregar a amostra e o carreador, uma bobina de reação (RC) para garantir que as soluções de HCl, NaBH₄, KI e as amostras de frutos secos, materiais de referência certificados ou brancos analíticos fossem misturadas. Dois conectores de metacrilato (CM: 1 – 2) para permitir o fluxo dos reagentes para a direção da bobina de reação. Uma válvula solenóide (V5) para possibilitar que a amostra fosse direcionada para a bobina de carga. Uma válvula solenóide (V6) para permitir que o líquido da bobina de carga seguisse para o sistema ou fosse redirecionado para o resíduo. Um separador gás-líquido (SGL) para separar o hidreto formado. Uma membrana de secagem (Perma pure Incorporation, New Jersey, USA) para evitar que umidade chegasse ao detector AFS (P.S. Analytical Millenium System, Kent, United Kingdom) e por consequência, perda da intensidade de fluorescência atômica.

O espectrômetro de fluorescência atômica (P.S. Analytical Millenium System, Kent, United Kingdom) equipado com lâmpadas de cátodo oco (Photron Super Lamp, Victoria, Australia) foi operado com os seguintes parâmetros: uma corrente primária de 27,5, 17,5 e 25,0 mA para As, Sb e Se, respectivamente, e uma corrente secundária de 35,0, 15,0 e 25,0 mA, respectivamente. Para as determinações foram usados os comprimentos de onda de 193,7 nm (As), 217,6 nm (Sb) e 196,0 nm (Se). Foram utilizados os gases: Ar conectado ao SGL, N₂ conectado à membrana de secagem e o H₂

conectado ao AFS. O sistema de controle do espectrômetro foi gerenciado pela aquisição e processamento dos dados utilizando o Software Autoanalysis 5.0® (Sciware, Palma de Mallorca, Espanha).

Figura 4.1. Esquema do sistema MSFIA-HG-AFS utilizado para análise de especiação química de As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Se(IV) e Se(VI) em frutos secos.



Legenda: S1 – S4 (seringas), V1 – V6 (válvulas solenóides), HC (bobina de carga), CM1 e CM2 (conectores de metacrilato), RC (bobina de reação), SGL (separador gás-líquido), AFS (espectrômetro de fluorescência atômica).

As características dos métodos propostos estão expressas na **Tabela 4.2.**

Tabela 4.2. Características instrumentais dos métodos propostos para a análise de especiação química de As, Sb e Se inorgânicos em frutos secos.

Características	
Fluxo de amostra (mL min ⁻¹)	4,0
Amostra (mL)	1,2
Fluxo de NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	2,0
NaBH ₄ (mL)	0,6
Fluxo de HCl (mL min ⁻¹)	2,0
HCl (mL)	0,6
Fluxo de KI (mL min ⁻¹)	1,0
KI (mL)	0,3
Taxa de fluxo do argônio (mL min ⁻¹)	300
Taxa de fluxo do hidrogênio (mL min ⁻¹)	35
Taxa de fluxo do gás de secagem (N ₂) (mL min ⁻¹)	300
Frequência de injeção (inj. h ⁻¹)	8
Tipo de sinal	Altura do pico

4.3.4. Procedimento para determinação de As, Sb e Se utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS

A sequência operacional para a análise de As(III) e total, Sb(III) e total, Se(IV) e total nas amostras de frutos secos está descrita na **Tabela 4.3**. O sistema foi composto de um total de 15 etapas: consistindo em carregar a amostra (5,2 mL) na bobina de carga e os reagentes nas seringas, iniciar a medida analítica, injetar por quatro vezes o volume de amostra (1,2 mL) e dos reagentes KI (0,3 mL), NaBH₄ (0,6 mL) e HCl (0,6 mL), sendo que o KI foi adicionado ao sistema (posição *On*) para determinações de As e Sb totais, e para as determinações de As(III), Sb(III), Se(IV) e Se total, o KI estava na posição *Off* (não era introduzido ao sistema, retornava ao recipiente), finalizar a medida e iniciar uma etapa de limpeza do sistema.

Tabela 4.3. Sequência operacional do procedimento automatizado para a análise de especiação química utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS.

Etapa	Operação	Válvulas solenóides					
		S1	S2	S3	S4	V5	V6
Determinação de As(III), As total, Sb(III), Sb total, Se(IV) ou Se total							
1	Dispensar soluções	Off	Off	Off	Off	Off	Off
2	Aspirar amostra para a HC	Off	Off	Off	On	On	Off
					5,2 (mL)		
3	Medida através do instrumento PSA Analytical Millenium	Iniciar medida a cada 1,0 segundo					
4	Início de carga	Iniciar a introdução da amostra					
5		Esperar 8 segundos					
6	Dispensar KI, NaBH ₄ , HCl e amostra para a RC	On/ Off*	On	On	On	Off	On
		0,3 (mL)	0,6 (mL)	0,6 (mL)	1,2 (mL)		
7		Esperar 60 segundos					
8	Fim de carga	Repetir 4 vezes para a amostra					
9	Medida através do instrumento PSA Analytical Millenium	Fim da medida					

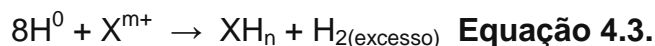
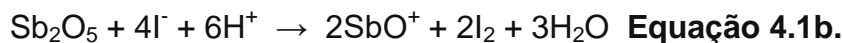
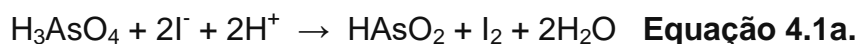
Tabela 4.3. (Continuação).

Etapa de limpeza							
10	Início de carga	Início da etapa de limpeza					
11	Aspirar <i>carrier</i> para a seringa S4	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>
		2,0 (mL)	4,0 (mL)	4,0 (mL)	8,0 (mL)		
12	Dispensar para o resíduo	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>On</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>
					4,0 (mL)		
13	Aspirar amostra residual do sistema	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>On</i>	<i>On</i>	<i>Off</i>
					2,0 (mL)		
14	Dispensar <i>carrier</i> para o resíduo	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>	<i>On</i>	<i>Off</i>	<i>Off</i>
					6,0 (mL)		
15	Fim de carga	Fim da limpeza do sistema					

*Posição “*On*” (os reagentes eram introduzidos no sistema) para as determinações de As ou Sb total / posição “*Off*” (os reagentes retornava ao respectivo recipiente) para as determinações de As(III), Sb(III), Se(IV) ou Se total.

Para a determinações de As total ou Sb total, ocorria primeiro uma pré-redução do As(V) para As(III) ou Sb(V) para Sb(III), respectivamente, utilizando o KI como agente pré-redutor, conforme **Equação 4.1a** e **4.1b**, respectivamente. Após isto, o sistema introduzia o NaBH₄ para reagir com as espécies reduzidas, As(III) ou Sb(III), e o HCl, determinando desta maneira, a concentração das espécies totais, conforme **Equações 4.2** e **4.3**. Para as determinações de As(III) ou Sb(III), não era introduzido no sistema o KI para evitar a pré-redução das espécies (V), introduzindo apenas o NaBH₄ e o HCl,

conforme **equações 4.2 e 4.3**. As concentrações das espécies de As(V) ou Sb(V) foram calculadas a partir das **Equações 4.4 e 4.5**, respectivamente:

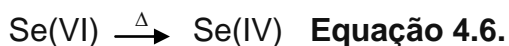


$$C_{\text{As(V)}} = C_{\text{As total}} - C_{\text{As(III)}} \quad \text{Equação 4.4.}$$

$$C_{\text{Sb(V)}} = C_{\text{Sb total}} - C_{\text{Sb(III)}} \quad \text{Equação 4.5.}$$

em que, X é As(III), Sb(III) ou Se(IV), e C é a concentração da espécie determinada.

Para a determinação do Se total foi necessária uma etapa de aquecimento a 80 °C por 15 min em banho-maria para que todo o Se presente fosse convertido em Se(IV), conforme **Equação 4.6**. Após isto, as amostras foram levadas ao sistema e introduzidas em conjunto com o HCl e o NaBH₄, conforme **Equações 4.2 e 4.3**. Para a determinação do Se(IV) não foi necessária etapa de pré-redução, sendo introduzidas as amostras e as soluções de HCl e NaBH₄, conforme **Equações 4.2 e 4.3**. A determinação da concentração do Se(VI) foi realizada através da **Equação 4.7**.



$$C_{\text{Se(VI)}} = C_{\text{Se total}} - C_{\text{Se(IV)}} \quad \text{Equação 4.7.}$$

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. Otimização das condições experimentais para a análise de especiação química de As e Sb

Para a otimização do sistema MSFIA-HG-AFS para a análise de especiação química de As e Sb, foi empregado um planejamento Doehlert com três variáveis para avaliar as condições de formação dos hidretos, em uma amostra de frutos secos (amostra 9). Os parâmetros avaliados foram as concentrações de NaBH₄, HCl e KI, de acordo com os domínios experimentais mostrados na **Tabela 4.4**. As variáveis e seus respectivos domínios foram selecionados com base em trabalhos reportados na literatura (Portugal *et al.* 2015; de Santana *et al.* 2016; Junior *et al.* 2017). Os experimentos foram realizados de maneira aleatória. Após a aplicação do planejamento, as intensidades de fluorescência de As e Sb foram obtidas para cada experimento e utilizadas para calcular a múltipla resposta (MR) (Novaes *et al.*, 2016). A MR foi calculada conforme a **Equação 4.1**.

$$MR = (\text{sinal As} / \text{máx. sinal As}) + (\text{sinal Sb} / \text{máx. sinal Sb}) \quad \text{Equação 4.1.}$$

em que, “sinal As” é a intensidade de fluorescência de As total obtida em cada experimento, “máx. sinal As” é a intensidade de fluorescência máxima de As total obtida no planejamento Doehlert proposto, a mesma lógica se aplica a obtenção das intensidade de fluorescência de Sb total.

Tabela 4.4. Planejamento Doehlert com três variáveis obtido para a análise de especiação química de As e Sb totais utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS.

Experimento	NaBH ₄ (% <i>, m v⁻¹</i>)	KI (% <i>, m v⁻¹</i>)	HCl (mol L ⁻¹)	MR
1	0 / 0,4	0 / 12,50	0 / 3,5	1,288
2	1 / 0,6	0 / 12,50	0 / 3,5	1,528
3	0,5 / 0,5	0,866 / 15,00	0 / 3,5	1,467
4	0,5 / 0,5	0,289 / 13,33	0,817 / 5,0	1,423
5	-1 / 0,2	0 / 12,50	0 / 3,5	0,749
6	-0,5 / 0,3	-0,866 / 10,00	0 / 3,5	0,648
7	-0,5 / 0,3	-0,289 / 11,67	-0,817 / 2,0	0,768
8	0,5 / 0,5	-0,866 / 10,00	0 / 3,5	1,120
9	0,5 / 0,5	-0,289 / 11,67	-0,817 / 2,0	1,316
10	-0,5 / 0,3	0,866 / 15,00	0 / 3,5	0,905
11	0 / 0,4	0,577 / 14,17	-0,817 / 2,0	1,446
12	-0,5 / 0,3	0,289 / 13,33	0,817 / 5,0	0,914
13	0 / 0,4	-0,577 / 10,83	0,817 / 5,0	1,050
14	0 / 0,4	0 / 12,50	0 / 3,5	1,212
15	0 / 0,4	0 / 12,50	0 / 3,5	1,230

Valor codificado / valor experimental. Volume fixado (mL): NaBH₄ (0,6), KI (0,3), HCl (0,6) e amostra (1,2).

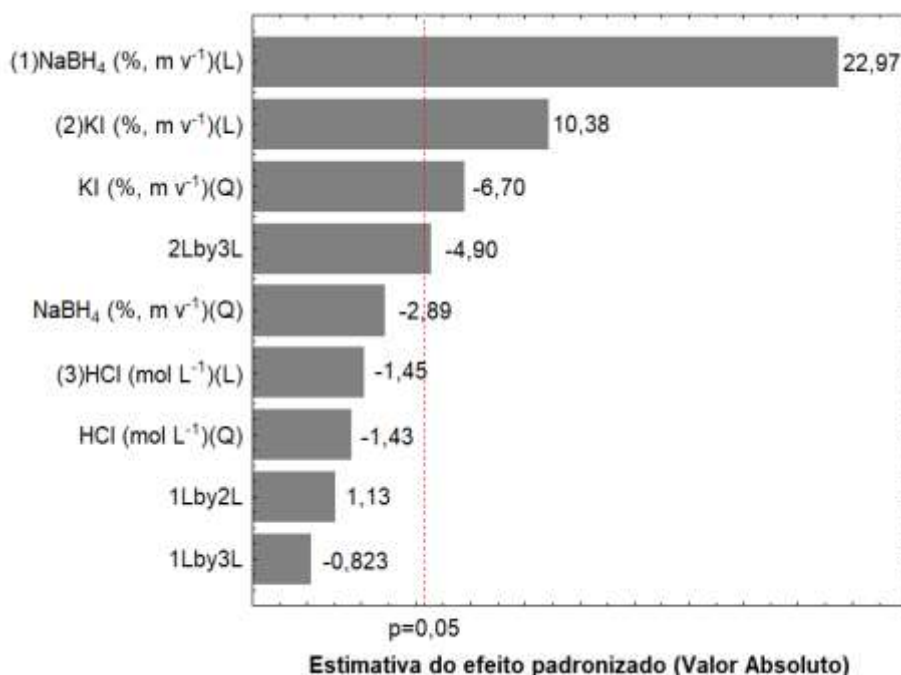
Após o processamento dos dados utilizando o Software Statistica® 6.0 (StatSoft, Tulsa, EUA), foi obtido o gráfico de Pareto para avaliar quais variáveis foram mais significativas para o sistema, conforme **Figura 4.1**. Uma avaliação dessa figura mostra que:

(a) a concentração de NaBH₄ (efeito padronizado = 22,97) foi o fator principal com o maior efeito positivo, estando coerente porque é o reagente que participa diretamente na formação dos hidretos;

(b) a concentração de KI (efeito padronizado = 10,38) foi o segundo fator principal mais importante, com um efeito positivo, o que pode ser explicado porque é um agente redutor, e quanto maior a sua concentração, maior a quantidade de analito reduzido para permitir a formação dos hidretos;

(c) a concentração de HCl não foi um efeito significativo, indicando que a sua concentração não influenciou diretamente na formação dos hidretos. Entretanto, a variável necessita ser estudada porque a sua interação com o KI (efeito padronizado = -4,90) mostrou-se significativa.

Figura 4.1. Gráfico de Pareto obtido para o Planejamento Doehlert usado para a otimização dos parâmetros de análise de especiação química de As e Sb totais usando o sistema MSFIA-HG-AFS.



Observando os gráficos de contorno obtidos a partir da função matemática usando planejamento Doehlert, foi possível perceber que à medida que a concentração de NaBH₄ estava em seu valor máximo (0,6 % m v⁻¹) e a concentração de KI estava em seu valor de ponto central (12,5 % m v⁻¹), a resposta obtida estava na região de máximo do gráfico obtido, conforme **Figura 4.2.**

Com a concentração de NaBH₄ também em seu valor máximo e a concentração de HCl em seu valor de ponto central (3,5 mol L⁻¹), a resposta obtida também se encontrava em uma região de máximo, conforme **Figura 4.3.** Corroborando com o resultado de MR observado para o planejamento, onde a maior múltipla resposta (1,528) foi obtida no experimento 2, o qual utiliza uma concentração de NaBH₄ de 0,6% (m v⁻¹), KI de 12,5% (m v⁻¹) e HCl de 3,5 mol L⁻¹, sendo portanto, este experimento escolhido como condição ótima para a realização da análise de especiação química de As e Sb.

Figura 4.2. Gráfico de contorno obtido para as variáveis concentração de NaBH₄ e concentração de KI, do planejamento Doehlert para a análise de especiação química de As e Sb.

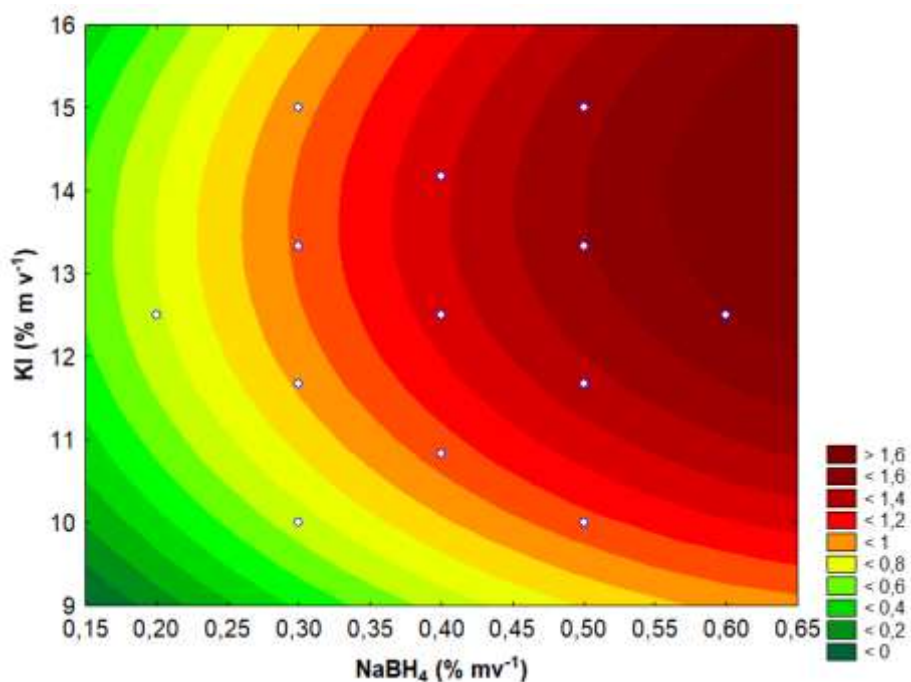
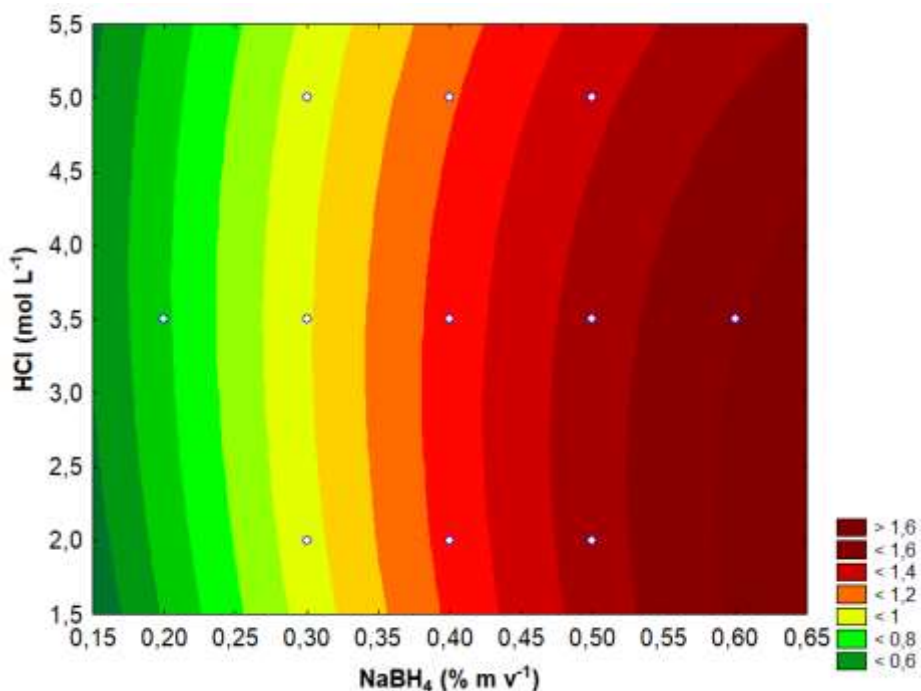


Figura 4.3. Gráfico de contorno obtido para as variáveis concentração de NaBH₄ e concentração de HCl, do planejamento Doehlert para a análise de especiação química de As e Sb.



O planejamento proposto também foi avaliado através da análise de variância (ANOVA), conforme **Tabela 4.5**, sendo que o modelo quadrático obtido não mostrou uma falta de ajuste significativa, indicando que os dados obtidos para o planejamento podem ser explicados pelo modelo gerado.

Tabela 4.5. Análise de variância (ANOVA) obtida para o planejamento Doehlert para os elementos As e Sb totais.

Fator	S.Q.	g.l.	M.Q.	Valor-F	Valor-p
(1)NaBH₄ (% m v⁻¹)(L)	0,8322	1	0,8322	527,6	1,89 x 10⁻³
NaBH ₄ (% m v ⁻¹) (Q)	1,32 x 10 ⁻²	1	1,32 x 10 ⁻²	8,36	0,1017
(2)KI (% m v⁻¹)(L)	0,1700	1	0,1700	107,8	9,15 x 10⁻³
KI (% m v ⁻¹)(Q)	7,08 x 10 ⁻²	1	7,08 x 10 ⁻²	44,9	2,16 x 10 ⁻²
(3)HCl (mol L ⁻¹)(L)	3,34 x 10 ⁻³	1	3,34 x 10 ⁻³	2,12	0,2828
HCl (mol L ⁻¹)(Q)	3,23 x 10 ⁻³	1	3,23 x 10 ⁻³	2,04	0,2889
1L by 2L	2,02 x 10 ⁻³	1	2,02 x 10 ⁻³	1,28	0,3747
1L by 3L	1,07 x 10 ⁻³	1	1,07 x 10 ⁻³	0,677	0,4970
2L by 3L	3,79 x 10⁻²	1	3,79 x 10⁻²	24,01	3,92 x 10⁻²
Falta de ajuste	3,00 x 10 ⁻²	3	3,00 x 10 ⁻²	6,33	0,1394
Erro puro	3,15 x 10 ⁻³	2	1,58 x 10 ⁻³		
S.Q. total	1,1454	14			

S.Q: soma dos quadrados; g.l: grau de liberdade; M.Q: Média quadrática

4.4.2. Otimização das condições experimentais para a análise de especiação química de Se

Em outra etapa, como não pode ser utilizada a solução de KI para evitar a redução do Se(IV) para Se(0), foram otimizadas as condições da geração de hidreto para o Se total apenas com as concentrações de NaBH₄ e HCl, através de um planejamento Doehlert para duas variáveis, conforme **Tabela 4.6**. A seringa do KI era sempre mantida na posição “Off” para retornar ao seu recipiente e assim, não participar das reações no sistema. As variáveis e seus respectivos domínios foram selecionados com base na literatura (de Santana *et al.* 2016). O planejamento foi avaliado utilizando a intensidade de fluorescência de Se obtido para os experimentos, em uma amostra de frutos secos (amostra 9).

Tabela 4.6. Planejamento Doehlert obtido para a análise de especiação química de Se usando o sistema MSFIA-HG-AFS.

Experimento	NaBH ₄ (% m v ⁻¹)	HCl (mol L ⁻¹)	Fluorescência Se total
1	0 / 0,4	0 / 3,5	8,47
2	1 / 0,6	0 / 3,5	12,16
3	0,5 / 0,5	0,866 / 5,0	4,89
4	-1 / 0,2	0 / 3,5	6,23
5	-0,5 / 0,3	-0,866 / 2,0	7,98
6	0,5 / 0,5	-0,866 / 2,0	10,37
7	-0,5 / 0,3	0,866 / 5,0	5,53
8	0 / 0,4	0 / 3,5	8,85
9	0 / 0,4	0 / 3,5	8,01

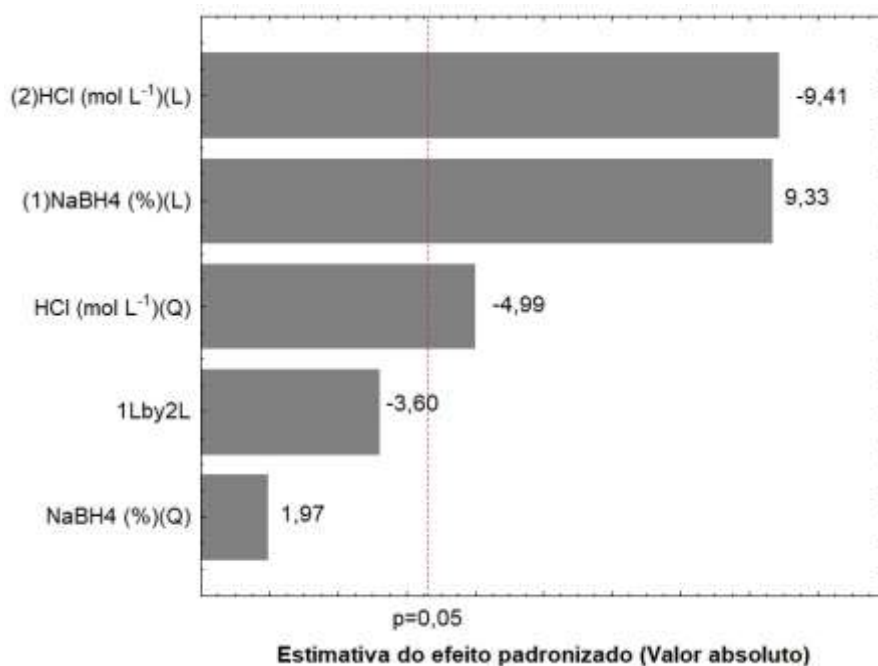
Valor codificado / valor experimental. Volume fixado (mL): NaBH₄ (0,6), HCl (0,6) e amostra (1,2).

Após a aplicação do planejamento Doehlert para duas variáveis, os dados foram processados utilizando um software estatístico, obtendo o gráfico de Pareto mostrado na **Figura 4.4**, sendo possível perceber que:

(a) a variável mais significativa foi a concentração da solução de HCl (efeito padronizado = -9,41) com efeito negativo, indicando que um aumento na sua concentração diminui o sinal analítico gerado. Esta diminuição pode ser explicada através da reação de formação do hidreto, que em meio ácido, a solução NaBH₄ possui uma maior produção do gás hidrogênio, diluindo o sinal analítico do Se (D'Ulivo, 2010);

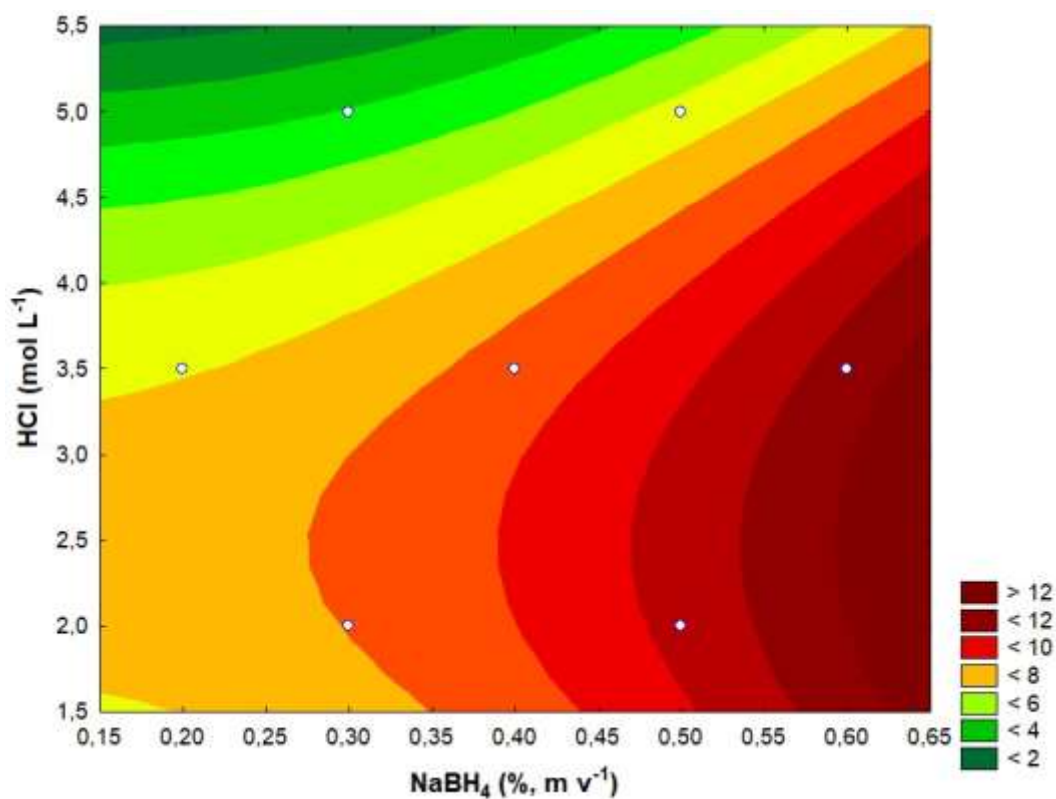
(b) a segunda variável mais significativa foi a concentração da solução de NaBH₄ (efeito padronizado = 9,33) com efeito positivo. Isto ocorre porque em concentrações mais elevadas o NaBH₄ participa mais eficazmente da reação de formação do hidreto.

Figura 4.4. Gráfico de Pareto obtido para o Planejamento Doehlert usado para a otimização dos parâmetros de análise de especiação química de Se usando o sistema MSFIA-HG-AFS.



Observando o gráfico de contorno obtido para o planejamento Doehlert para Se, foi possível perceber que à medida que a concentração da solução de NaBH₄ estava em seu valor máximo (0,6 %, m v⁻¹) e a concentração da solução de HCl no valor de ponto central (3,5 mol L⁻¹), a resposta obtida estava em uma região de máximo, que foi o experimento 2, conforme **Tabela 4.6** e **Figura 4.5**. E estas condições foram escolhidas como ótimas para a realização dos experimentos posteriores.

Figura 4.5. Gráfico de contorno obtido para as variáveis concentração da solução de NaBH₄ e concentração da solução de HCl, do planejamento Doehlert para a análise de especiação química de Se.



O planejamento também foi avaliado através da análise de variância (ANOVA), conforme **Tabela 4.7**, onde foi possível perceber que o modelo quadrático obtido para o planejamento não possuiu falta de ajuste, indicando que os resultados obtidos para o planejamento podem ser explicados pelo modelo gerado.

Tabela 4.7. Análise de variância (ANOVA) obtida para o planejamento Doehlert com duas variáveis para geração do hidreto de Se.

Fator	S.Q.	g.l.	M.Q.	Valor-F	Valor-p
(1)NaBH₄ (%) (L)	15,41	1	15,41	87,11	0,0113
NaBH ₄ (%)(Q)	0,6870	1	0,6870	3,88	0,1876
(2)HCl (mol L⁻¹) (L)	15,68	1	15,68	88,63	0,0111
HCl (mol L⁻¹) (Q)	4,40	1	4,40	24,86	0,0379
1L by 2L	2,29	1	2,29	12,94	0,0693
Lack of Fit	2,91	1	2,91	16,45	0,0557
Error	0,3539	2	0,1769		
Total SS	42,67	8			

S.Q: soma dos quadrados; g.l: grau de liberdade; M.Q: Média quadrática

4.4.3. Validação do sistema MSFIA-HG-AFS

Os parâmetros analíticos limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, foram determinados utilizando as condições experimentais obtidas através dos planejamentos Doehlert.

4.4.3.1. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ) foram obtidos de acordo com as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), multiplicando por 3 e 10 vezes, o valor do desvio padrão obtido através das análises de dez replicatas da solução branco, respectivamente, dividido pela inclinação da curva de calibração para cada analito. Os valores de LoD e LoQ estão expressos na **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8. Limites de detecção e quantificação obtidos para análise de As(III) e total, Sb(III) e total e Se(IV) e total utilizando o sistema MSFIA-HG-AFS.

Espécie	LoD (ng g ⁻¹)	LoQ (ng g ⁻¹)
As total	4,6	15
As(III)	1,2	3,9
Sb total	0,10	0,34
Sb(III)	0,45	1,5
Se total	1,0	3,3
Se(IV)	2,1	7,0

4.4.3.2. Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão do método foram avaliadas através da análise do material de referência certificado de músculo de peixe (DORM-2, Dogfish muscle) e dos testes de adição e recuperação, conforme **Tabelas 4.9 e 4.10**, respectivamente. A exatidão, avaliada como a concordância entre os valores encontrados e os valores certificados no CRM DORM-2, onde através do somatório das espécies de As(III) e (V), Sb(III) e (V), Se(IV) e (VI) foi possível obter a concentração total dos analitos com exatidão de $91,1 \pm 2,6 \%$ (As) e $98,0 \pm 2,0 \%$ (Se). A precisão, expressa como desvio padrão relativo (RSD, $n=3$), foi igual a $2,9\%$ (As) e $0,83\%$ (Se). Para o Sb, não foi possível avaliar a exatidão do método porque o CRM não possui valor para esse elemento químico, entretanto, foram encontradas concentrações de $0,234 \pm 0,019 \text{ mg kg}^{-1}$ e um valor de RSD igual a $3,2\%$. Com isso, foram realizados testes de adição e recuperação das espécies em estudo.

Foram realizados três níveis de adição: 20, 50 e 100 ng g^{-1} , para as espécies As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Se(IV) e Se(VI), em uma amostra que continha uma mistura de frutos secos (amostra 9), as espécies nos três níveis de concentração foram adicionadas todas juntas em cada nível de adição antes da digestão parcial. As recuperações variaram entre $82,2 \pm 1,1\%$ para Se(VI) e $116 \pm 6,7\%$ para As(III), evidenciando que não houve conversão das espécies adicionadas. O valor de RSD foi menor do que $9,8\%$ para todas as espécies,

indicando boa precisão e exatidão do método proposto. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4.10**.

Tabela 4.9. Resultados obtidos para As, Sb e Se totais, após as análises do material de referência certificado de músculo de peixe (DORM-2, Dogfish muscle) para avaliação da exatidão e precisão do método MSFIA-HG-AFS.

Espécie	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor encontrado (mg kg⁻¹)	Concordância (%)	RSD (%)
As total	18,0 ± 1,1	16,4 ± 2,1	91,1 ± 2,6	2,9
As(III)	n.i.	3,4 ± 0,9	n.d.	3,3
As(V)	n.i.	13,0 ± 5,3	n.d.	4,5
Sb total	n.i.	0,234 ± 0,019	n.d.	3,2
Sb(III)	n.i.	0,176 ± 0,013	n.d.	3,0
Sb(V)	n.i.	0,058 ± 0,006	n.d.	4,1
Se total	1,40 ± 0,09	1,37 ± 0,03	98,0 ± 2,0	0,83
Se(VI)	n.i.	0,113 ± 0,035	n.d.	2,1
Se(IV)	n.i.	1,26 ± 0,06	n.d.	1,9

Todos os resultados estão expressos como média ± intervalo de confiança a 95% (n = 3) // n.i. = não informado // n.d. = não determinado.

Tabela 4.10. Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação para as espécies As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Se(IV) e Se(VI) em uma amostra de frutos secos (amostra 9).

Analito	Valor encontrado (ng g ⁻¹)	Valor adicionado (ng g ⁻¹)	Valor encontrado após a adição (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Recuperação (%)
As(III)	<3,9	0	<3,9	n.d.	n.d.
		20	23,2 ± 1,3	5,7	116,0 ± 6,7
		50	49,3 ± 3,8	7,6	98,7 ± 7,5
		100	98,8 ± 9,2	9,4	98,8 ± 9,2
As (V)	<15	0	<15	n.d.	n.d.
		20	16,5 ± 1,5	8,9	82,6 ± 7,4
		50	46,7 ± 1,6	3,5	93,4 ± 3,3
		100	100,4 ± 1,8	1,8	100,0 ± 1,8
Sb(III)	8,2 ± 0,6	0	8,2 ± 0,6	7,2	n.d.
		20	26,2 ± 0,6	2,3	90,3 ± 3,0
		50	60,3 ± 4,5	7,4	104,0 ± 8,9
		100	96,0 ± 1,7	1,7	87,8 ± 1,7
Sb (V)	13,9 ± 1,2	0	13,9 ± 1,2	8,7	n.d.
		20	34,5 ± 0,7	2,1	103,0 ± 3,7
		50	62,9 ± 3,4	5,4	98,0 ± 6,8
		100	103,3 ± 3,4	3,3	89,4 ± 3,4
Se(IV)	10,2 ± 0,5	0	10,2 ± 0,5	4,7	n.d.
		20	32,9 ± 2,2	9,8	113,0 ± 11
		50	62,3 ± 2,9	5,5	104,0 ± 5,8
		100	116,4 ± 3,7	2,7	108,0 ± 3,0
Se (VI)	37,8 ± 3,4	0	37,8 ± 3,4	9,1	n.d.
		20	54,2 ± 0,2	1,1	82,2 ± 1,1
		50	95,9 ± 0,8	1,4	116,0 ± 1,6
		100	121,0 ± 5,7	6,8	83,2 ± 5,7

Todos os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

4.4.4. Aplicação analítica em amostras de frutos secos

O método proposto foi empregado para a análise de especiação química de As(III) e (V), Sb(III) e (V), e Se(IV) e (VI) em nove amostras de frutos secos coletadas em estabelecimentos comerciais da cidade de Palma de Mallorca, Espanha. Os resultados estão mostrados na **Tabela 4.11**. As concentrações de

As(III) e As(V) em todas as amostras foram menores do que os LoQ (3,9 e 15,0 ng g⁻¹, respectivamente) do método analítico proposto.

As concentrações de Sb(III) variaram de $3,8 \pm 0,1$ ng g⁻¹ em *Prunus amygdalus dulcis* natural com pele (amostra 4) a $8,2 \pm 0,2$ ng g⁻¹ em uma mistura de *Arachis hipogea* L., *Corylus avellana* L., *Anacardium occidentale* L. e *Prunus amygdalus dulcis* tostadas e com sal (amostra 9). As concentrações de Sb(V) variaram de $1,6 \pm 0,1$ ng g⁻¹ em *Prunus amygdalus dulcis* frita e sem pele (amostra 3) a $13,9 \pm 1,2$ ng g⁻¹ em em uma mistura de *Arachis hipogea* L., *Corylus avellana* L., *Anacardium occidentale* L. e *Prunus amygdalus dulcis* tostadas e com sal (amostra 9). As concentrações de Sb total estavam de acordo com a literatura para alimentos (de Santana *et al.*, 2016).

As concentrações de Se(IV) variaram de $9,8 \pm 0,1$ ng g⁻¹ em *Prunus amygdalus dulcis* natural e com pele (amostra 4) e $102,5 \pm 7,4$ ng g⁻¹ em *Anacardium occidentale* L. natural e sem pele (amostra 6). Para as concentrações de Se(VI) variaram de $5,2 \pm 0,4$ ng g⁻¹ em *Corylus avellana* L. tostada sem pele e sem sal (amostra 1) a $90,5 \pm 9,8$ ng g⁻¹ em *Anacardium occidentale* L. natural e sem pele (amostra 6). As concentrações de Se total estavam de acordo com os valores reportados em trabalhos para alimentos (de Santana *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2017; Silva Junior *et al.*, 2017).

Tabela 4.11. Resultados da análise de especiação química em amostras de frutos secos para a determinação de As(III) e (V), Sb(III) e (V), e Se(IV) e (VI) utilizando MSFIA-HG-AFS. Concentração em ng g⁻¹.

Amostra	As(III)	As(V)	AsTotal	Sb(III)	Sb(V)	Sb Total	Se(IV)	Se(VI)	Se Total
1	<3,9	n.d.	<15,0	4,2 ± 0,3	2,4 ± 0,3	6,6 ± 0,2	10,3 ± 0,3	5,2 ± 0,4	15,5 ± 0,4
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	64,3	35,7	100,0	66,4	33,6	100,0
2	<3,9	n.d.	<15,0	4,2 ± 0,2	1,7 ± 0,4	5,9 ± 0,3	13,4 ± 1,1	14,7 ± 1,2	28,1 ± 0,6
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	72,2	27,8	100,0	47,7	52,3	100,0
3	<3,9	n.d.	<15,0	4,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	5,8 ± 0,1	10,8 ± 0,1	12,5 ± 0,5	23,3 ± 0,5
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	72,9	27,1	100,0	46,4	53,6	100,0
4	<3,9	n.d.	<15,0	3,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	5,4 ± 0,1	9,7 ± 0,1	5,3 ± 0,7	15,1 ± 0,6
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	70,4	29,6	100,0	64,6	35,4	100,0
5	<3,9	n.d.	<15,0	4,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	6,0 ± 0,1	42,3 ± 1,3	38,4 ± 1,2	80,7 ± 0,9
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	69,8	30,2	100,0	52,4	47,6	100,0
6	<3,9	n.d.	<15,0	3,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	5,6 ± 0,2	102,5 ± 7,4	90,5 ± 9,8	193,0 ± 11,1
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	70,5	29,5	100,0	53,0	47,0	100,0
7	<3,9	n.d.	<15,0	4,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	6,0 ± 0,4	10,2 ± 0,4	7,98 ± 1,0	18,2 ± 1,0
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	71,6	28,4	100,0	56,0	44,0	100,0
8	<3,9	n.d.	<15,0	4,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	5,8 ± 0,1	12,2 ± 1,0	14,2 ± 2,1	26,4 ± 1,7
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	72,3	27,7	100,0	46,2	53,8	100,0
9	<3,9	n.d.	<15,0	8,2 ± 0,6	14,0 ± 1,2	22,2 ± 2,5	10,2 ± 0,5	37,8 ± 3,4	48,0 ± 3,2
(%)	n.d.	n.d.	n.d.	37,1	62,9	100,0	21,2	78,8	100,0

Todos os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

4.5. Considerações finais

Os planejamentos Doehlert empregados foram eficientes na obtenção das condições ótimas para as concentrações das soluções NaBH₄, HCl e KI utilizadas na análise de especiação química de As, Sb e Se em amostras de frutos secos empregando MSFIA-HG-AFS.

Os métodos propostos foram exatos, precisos e mostraram alta sensibilidade, o que possibilitou as determinações das espécies As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Se(IV) e Se(VI) em amostras de frutos secos.

As concentrações de Sb(III) e Sb(V) foram maiores na amostra contendo uma mistura de *Arachis hipogea* L., *Corylus avellana* L., *Anacardium occidentale* L. e *Prunus amygdalus dulcis*. Ainda que em baixas concentrações, deve ser dada atenção porque a forma trivalente do antimônio é a mais tóxica e um consumo excessivo pode acarretar danos à saúde humana.

A amostra de *Anacardium occidentale* L. apresentou as maiores concentrações de Se(IV) e Se(VI). A presença das espécies inorgânicas de selênio chama atenção porque são mais tóxicas, porém, as concentrações não acarretam danos através do consumo moderado dos frutos secos. As espécies As(III) e As(V) estavam com as concentrações abaixo dos LoQ do método para todas as amostras.

As concentrações encontradas de As, Sb e Se em amostras de frutos secos estavam concordantes com os valores encontrados por outros autores reportados na literatura.

Capítulo 5. Conclusões

Com os resultados obtidos a partir da utilização de planejamentos de experimentos nos três trabalhos realizados, foi possível verificar a presença de 23 elementos químicos presentes em ração animal, dentre os quais, elementos potencialmente tóxicos, como As, Cd, Cr, Pb, Sb e Se, que embora em níveis baixos, são relevantes para a necessidade de elaborar normas mais eficazes para o controle destes alimentos, no intuito de evitar possíveis contaminações ao longo da cadeia alimentar.

O preparo de amostra de caldo de cana de açúcar na forma de suspensão permitiu a determinação de Ca, Cu, Fe, K e Mg por ICP OES, e possibilitou a aplicação de uma metodologia simples, rápida e confiável em análises de rotina para o controle de alimentos.

A metodologia para a análise de especiação química, possibilitou observar a presença das espécies Sb(III), Sb(V), Se(IV) e Se(VI) em amostras de frutos secos, que mesmo com as concentrações em baixos níveis, deve ser dada atenção porque são espécies tóxicas, que se ingeridas em grandes quantidades, podem causar danos à saúde humana.

Perspectivas de trabalhos

Como perspectivas de trabalhos, poderão ser realizados a análise de especiação química e a bioacessibilidade dos elementos químicos em amostras de rações animais, no intuito de avaliar possíveis impactos à saúde deles.

Estudos para a determinação de elementos químicos via molécula em alimentos de consumo humano e animal empregando espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite (HR-CS-GF MAS).

Determinação da composição mineral de rações animais através da análise direta de amostras por espectrometria de fluorescência de raios X com energia dispersiva (EDXRF).

Referências

AAFCO – Association of American Feed Control Officials (2003). Label Design & Format – Non-pet food. Disponível em: <<http://iowaagriculture.gov/feedAndFertilizer/pdfs/labelGuide.pdf>>. Acesso em 13 de julho de 2017.

Albani, J. R. (2007). Principles and applications of fluorescence spectroscopy. ISBN 978-1-4051-3891-8.

Alves, S. P., Alfaia, C. M., Škrbić, B. D., Živančev, J. R., Fernandes, M. J., Bessa, R. J. B., Fraqueza, M. J. (2017). Screening chemical hazards of dry fermented sausages from distinct origins: Biogenic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy elements. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 124-131.

Amaral, C. D. B., Dionísio, A. G. G., Santos, M. C., Donati, G. L., Nóbrega, J. A., Nogueira, A. R. A. (2013). Evaluation of sample preparation procedures and krypton as an interference standard probe for arsenic speciation by HPLC-ICP-QMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28, 1303-1310.

Amorim, F. A. C., Costa, V. C., da Silva, E. G. P., Lima, D. C., de Jesus, R. M., Bezerra, M. A. (2017). Multivariate optimization of simple procedure for determination of Fe and Mg in cassava starch employing slurry sampling and FAAS. *Food Chemistry*, 227, 41 – 47.

Amorim, F. A. C., Costa, V. C., Guedes, W. N., de Sá, I. P., dos Santos, M. C., da Silva, E. G. P., Lima, D. C. (2016). Multivariate optimization of method of slurry sampling for determination of iron and zinc in starch samples by flame atomic absorption spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9, 1719-1725.

Asghari. G., Ghorbani. Z., Mirmiran. P., Azizi. F. (2017). Nut consumption is associated with lower incidence of type 2 diabetes: The theran lipid and glucose study. *Diabetes & Metabolism*, 43, 18-24.

ATSDR – Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Toxic Substances Portal, Arsenic. Available in <<https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=3>> Access in January 04, 2019.

ATSDR – Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Toxicological Profile for Selenium (2003). Available in <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp92.pdf>> Access in January 04, 2019.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2017). The ATSDR 2017 Substance Priority List. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>> Acesso em: 23 de Julho de 2018.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2018). Toxic Substances Portal. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/substances/indexAZ.asp>> Acesso em: 23 de Julho de 2018.

ATSDR^a – Agency for Toxic Substances & Disease Registry. The ATSDR 2017 Substance Priority List. Available in <<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>> Access in January 04, 2019.

ATSDR^b – Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Toxicological profile for antimony and compounds. Draft for public comment (2017). Available in <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp23.pdf>> Access in January 04, 2019.

Ávila, D. V. L., Souza, S. O., Costa, S. S. L., Garcia, C. A. B., Alves, J. P. H., Araujo, R. G. O., Passos, E. A. (2017). Multivariate optimization of conditions for digestion of wet feeds for dogs and cats using a closed digester block and multielement determination by ICP-OES. *Journal of AOAC International*, 100, 1483-1491.

Bakirdere, S., Volkan, M., Ataman, O. Y. (2018). Selenium speciation in chicken breast samples from inorganic and organic selenium fed chickens using high

performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 71, 28-35.

Barbosa, I. S., Brito, G. B., dos Santos, G. L., Santos, L. N., Teixeira, L. S. G., Araujo, R. G. O., Korn, M. G. A. (2019). Multivariate data analysis of trace elements in bivalve molluscs: Characterization and food safety evaluation. *Food Chemistry*, 273, 64-70.

Barnes, R. M., Júnior, D. S., Krug, F. J. (2014). Chapter 1: Introduction to sample preparation for trace element determination. *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*, 1-58.

Barros, J. M., Bezerra, M. A., Valasques, G. S., Nascimento Júnior, B. B., Souza, A. S., de Aragão, N. M. (2013). Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction procedure for Cu, Mn, Ni and Zn determination in ration to chickens. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85, 3, 891-902.

Beshkenadze, I., Chagelishvili, A., Begheluri, G., Zhorzholiani, N., Gogaladze, M., Urotadze, S., Klarjeishvili, N. (2016). New generation premixes for rabbit nutrition. *Annals of Agrarian Science*, 14, 288-291.

Bezerra, M. A., Ferreira, S. L. C., Novaes, C. G., dos Santos, A. M. P., Valasques, G. S., Cerqueira, U. M. F., Alves, J. P. S. (2019). Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. *Talanta*, 194, 941-959.

Bilandžić, N., Sedak, M., Đokić, M., Varenina, I., Kolanović, B. S., Božić, Đ., Brstilo, M., Šimić, B. (2014). Determination of zinc concentration in foods of animal origin, fish and shellfish from Croatia and assessment of their contribution to dietary intake. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35, 61-66.

Bizzi, C. A., Flores, É. M. M., Picoloto, R. S., Barin, J. S., Nóbrega, J. A. (2010). Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with

oxygen on digestion process with diluted nitric acid. *Analytical Methods*, 2, 734-738.

Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K. (2016). International Agency for research on Cancer Monograph Working Group (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, 16 (16) 1599-1600.

Brady, D. V., Montalvo, J. L., Glowacki, G., Pisciotto, A. (1974). Direct determination of zinc in sea-bottom sediments by carbono tube atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 70, 448-452.

Brasil^a (2016). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016). Codex Alimentarius. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/10d276cf-99d0-47c1-80a5-14de564aa6d3> Acesso em: 28 de Maio de 2017.

Brasil^b (2007). MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2007). Instrução Normativa N^o4, de 01 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizadorAtoPortalMapa&chave=1864199569>> Acesso em: 22 de Março de 2017.

Brasil^c (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Bebida saudável: normas de higiene para sucos e caldo de cana. Boletim informativo, 57, 6 – 8.

Brasil^d (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 269 de 22 de setembro de 2005. O Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3bdd1-f96162d607b3> Acesso em: 05 de Janeiro de 2018.

Brasil^e (1965). Decreto nº 55871 de 26 de março de 1965. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/anexo/AN55871-65.PDF> Acesso em: 06 de Julho de 2017.

Brasil^f (1998). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Portaria nº 685, de 27 de Agosto de 1998. Disponível em: : <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8c494f804745801a8c00dc3fbc4c6735/PORTARIA%2BN%2B%C2%BA%2B685,%2BDE%2B27%2BDE%2BAGOSTO%2BDE%2B1998.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 05 de Julho de 2017.

Brasil^g (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 42, de 29 de Agosto de 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8100bb8040eac2e8b590b79cca79f4cf/RDC+n%C2%BA+42_2013_final.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 05 de Julho de 2017.

Brasil^h, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). Instrução Normativa nº15, de 26 de maio de 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-15-de-26-de-maio-de-2009.pdf/view>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

Brasilⁱ, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2004). Instrução Normativa N°13, de 01 de dezembro de 2004. Disponível em: <http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizadorAtoPortalMapa&chave=133040692>. Acesso em: 22 de Março de 2017.

Brasil^j, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). Instrução Normativa N°03, de 23 de janeiro de 2009. Disponível em: <<http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?meth>

od=visualizarAtoPortalMapa&chave=76311575> Acesso em: 27 de Março de 2017.

Brasil^k, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). Instrução Normativa N°30, de 30 de agosto de 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-30-de-5-de-agosto-de-2009.pdf>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

Brasil^l, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). Instrução Normativa N°15, de 26 de maio de 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-15-de-26-de-maio-de-2009.pdf>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

Brasil^m, Disponível em: <<http://alconpet.com.br/produto/alcon-club-exoticos>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

Brasilⁿ, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2004). Instrução Normativa N°12, de 02 de dezembro de 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-12-de-30-de-novembro-de-2004.pdf>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

Brasil^o, Disponível em: <<http://bigsal.com.br/produtos.php>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

Brasil^p, IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Estatística da Produção Pecuária jan. – mar. (2018). Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_1tri.pdf> Acesso em: 17 de Agosto de 2018.

Brasil^q, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017). Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA. Volume 3, 2017. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/publicacoes-dipoa> Acesso em: 27 de Julho de 2018.

Brasil^r, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n° 179, de 17 de outubro de 2001. Aprova a extensão de uso dos Aditivos INS 45 li Tripolifosfato de sódio e INS 466 Carboximetilcelulose de sódio como estabilizantes em produtos cárneos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao+RDC+n+179+de+17+de+outubro+de+2001.pdf/05e357a5-11ec-4311-9809-560bb5665349>> Acesso em: 24 de Julho de 2018.

Brochier, B., Mercali, G. D., Marczak, L. D. F. (2016). Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT – Food Science and Technology*, 74, 396 – 403.

Butcher, D. J. (2005). Atomic fluorescence spectrometry, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Editors), *Encyclopedia of Analytical Science*, second ed., Elsevier, Oxford, 2005, p. 221-228.

Callao, M. P., Ruisánchez, I. (2018). An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. *Food Control*, 86, 283 – 293.

Castor, J. M. R., Portugal, L., Ferrer, L., Hinojosa-Reyes, L., Guzmán-Mar, J. L., Hernández-Ramírez, A., Cerdà, V. (2016). An evaluation of the bioaccessibility of arsenic in corn and rice samples based on cloud point extraction and hydride generation coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, 204, 475-482.

Cerdà, V., Estela, J. M., Fortaleza, R., Cladera, A., Becerra, E., Altimira, P., Sitjar, P. (1999). Flow techniques in water analysis. *Talanta*, 50, 695-705.

Cerdà, V., Ferrer, L., Portugal, L., de Souza, C. T., Ferreira, S. L. C. (2018). Multisyringe flow injection analysis in spectroanalytical techniques – A review. *Trends in Analytical Chemistry*, 98, 1-18.

Copat, C., Arena, G., Fiore, M., Ledda, C., Fallico, R., Sciacca, S., Ferrante, M. (2013). Heavy metals concentration in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: Consumption advisories. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 33-37.

Correia, F. O., Silva, D. S., Costa, S. S. L., Silva, I. K. V., da Silva, D. R., Alves, J. P. H., Garcia, C. A. B., Maranhão, T. A., Passos, E. A., Araujo, R. G. O. (2017). Optimization of microwave digestion and inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics. *Microchemical Journal*, 135, 190-198.

Costa, S. S. L., Pereira, A. C. L., Passos, E. A., Alves, J. P. H., Garcia, C. A. B., Araujo, R. G. O. (2013). Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES. *Talanta*, 108, 157 – 164.

Costa^a, V. C., Guedes, W. N., Santos, A. S., Nascimento, M. M. (2018). Multivariate optimization for the development of a fast and simple ultrasound-assisted extraction procedure for multielemental determination in tea leaves by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). *Food Analytical Methods*, 11, 2004-2012.

Costa^b, V. C., Silva, E. G. P., Lima, D. C., Franco, M., Jesus, R. M., Bezerra, M. A., Amorim, F. A. C. (2018). Use of mixture design with minimal restrictions to optimize an extraction procedure employing diluted acids assisted by ultrasound and microwave for nutrient element determination in vegetal samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29, 6, 1189-1198.

Costa^c, S. S. L., Pereira, A. C. L., Passos, E. A., Alves, J. P. H., Garcia, C. A. B., Araujo, R. G. O. (2018). Evaluation of the chemical composition of dry feeds for dogs and cats. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29, 12, 2616-2625.

Cubadda, F. (2007). Chapter 19. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Toxicant Analysis – Techniques, Strategies and Developments*. Doi: 10.1016/B978-044452843-8/50020-1

D’Ulivo, A. (2010). Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes Towards the clarification of most controversial aspects. *Spectrochimica Acta Part B*, 65, 360-375.

Da Costa, S. S. L., Pereira, A. C. L., Passos, E. A., Alves, J. P. H., Garcia, C. A. B., Araujo, R. G. O. (2013). Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES. *Talanta*, 108, 157-164.

Da Silva, D. G., Portugal, L. A., Serra, A. M., Ferreira, S. L. C., Cerdà, V. (2013). Determination of Mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, 137, 159-163.

Da Silva, D. G., Scarminio, I. S., Anunciação, D. S., Souza, A. S., da Silva, E. G. P., Ferreira, S. L. C. (2013). Determination of the mineral composition of Brazilian rice and evaluation using chemometric techniques. *Analytical Methods*, 5, 998-103.

Da Silva, D. L. F., da Costa, M. A. P., Silva, L. O. B., dos Santos, W. N. L. (2019). Simultaneous determination of Mercury and selenium in fish by CVG AFS. *Food Chemistry*, 273, 24 – 30.

Daniel, D., Santos, V. B., Vidal, D. T. R., Lago, C. L. (2015). Determination of halosulfuron-methyl herbicide in sugarcane juice and tomato by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 175, 82 – 84.

Dantas, A. N. S., Matos, W. O., Gouveia, S. T., Lopes, G. S. (2013). The combination of infrared and microwave radiation to quantify trace elements in organic samples by ICP OES. *Talanta*, 107, 292-296.

De Andrade, C. K., de Brito, P. M. K., dos Anjos, V. E., Quináia, S. P. (2018). Determination of Cu, Cd, Pb and Cr in yogurt by slurry sampling electrothermal

atomic absorption spectrometry: A case study fro Brazilian yogurt. *Food Chemistry*, 240, 268 – 274.

De Andrade, C. K., dos Anjos, V. E., Felsner, M. L., Torres, Y. R., Quináia, S. P. (2014). Direct determination of Cd, Pb and Cr in Honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 146, 166-173.

De Moraes, P. M., Loureiro, V. R., Padilha, P. M., Neves, R. C. F., Saleh, M. A. D., dos Santos, F. A., Silva, F. A. (2009). Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrometria no visível. *Química Nova*, 32, 4, 923-927.

De Oliveira^a, F. A., de Abreu, A. T., Nascimento, N. O., Froes-Silva, R. E. S., Antonini, Y., Junior, H. A. N., de Lena, J. C. (2017). Evaluation of metrix effect on the determination of rare earth elements and As, Bi, Cd, Pb, Se and In in honey and pollen of native Brazilian bees (*Tetragonisca angustula* – Jataí) by Q-ICP-MS. *Talanta*, 162, 488-494.

De Oliveira^b, T. M., Peres, J. A., Felsner, M. L., Justi, K. C. (2017). Direct determination of Pb in raw milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) with electrothermal atomization sampling from slurries. *Food Chemistry*, 229, 721 – 725.

De Santana, F. A., Portugal, L. A., Serra, A. M., Ferrer, L., Cerdà, V., Ferreira, S. L. C. (2016). Development of a MSFIA system for sequential determination of antimony, arsenic and selenium using hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 156-157, 29-33.

De Souza, C. T., Soares, S. A. R., Queiroz, A. F. S., dos Santos, A. M. P., Ferreira, S. L. C. (2016). Determination and evaluation of the mineral composition of breadfruit (*Artocarpus altilis*) using multivariate analysis technique. *Microchemical Journal*, 128, 84-88.

Dennaud, J., Howes, A., Poussel, E., Mermet, J. M. (2001). Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled

plasma atomic emission spectrometers. *Spectrochimica Acta Part B*, 56, 101-112.

Dionísio, A. G. G., Gonzalez, M. H., Nóbrega, J. A. (2011). Determinação de arsênio em amostras da cadeia produtiva de frangos de corte por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. *Química Nova*, 34, 1, 49-52.

Dobrowolski, R., Pawlowska-Kapusta, I., Dobrzynska, J. (2012). Chromium determination in food by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using classical and permanent modifiers. *Food Chemistry*, 132, 597-602.

Domingo, J. L., Nadal, M. (2017). Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 256-261.

Dos santos, J. M., Quináia, S. P., Felsner, M. L. (2018). Fast and direct analysis of Cr, Cd and Pb in brown sugar by GF AAS. *Food Chemistry*, 260, 19-26.

Dos Santos, M., Júnior, F. M. R. S., Muccillo-Baisch, A. L. (2017). Selenium content of Brazilian foods: A review of the literature values. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 10-15.

Dos Santos, W. N. L., Cavalcante, D. D., Gomes, P. D. N., Santos, D. C. M. B., Oliveira, L. B., Santos, G. S., Ferreira, S. L. C. (2016). Determination of selenium in eggs of different birds using sample digestion in a reflux system and hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Current Analytical Chemistry*, 12, 102-107.

Ebdon, L., Evans, E. H., Fisher, A. S., Hill, S. J. (1998). *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*. ISBN 0-471-97418-8.

Echegaray, N., Gómez, B., Barba, F. J., Franco, D., Estévez, M., Carballo, J., Marszałek, K., Lorenzo, J. M. (2018). Chestnut and by-products as source of

natural antioxidants in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 110-121.

EUA^a - Estados Unidos da América (2017). Careertech, Animal Nutrition and Digestion. Disponível em: <<http://www.okcareertech.org/educators/cimc/free-samples/ag-cluster/pdf-files/ag2student.pdf>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

EUA^b - Estados Unidos da América (2010). Algae for feed. Animal nutrient requirements. Disponível em: <<http://www.algae4feed.org/print.php?id=58>> Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

FAO^a – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). Food security statistics. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/en/>> Acesso em: 09 de Outubro de 2018.

FAO^b – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015). Hunger Map. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i467e.pdf>> Acesso em 28 de Maio de 2017.

FAO^c – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015). The State of Food Insecurity in the World 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/hunger/en/>> Acesso em: 28 de Maio de 2017.

FAO^d - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). Codex Alimentarius. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/>> Acesso em: 23 de Março de 2017.

FAO^e - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009). Codex Alimentarius, General standard for contaminants and toxins in food and feed (Codex Stan 193-1995). Disponível em: <www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf> Acesso em: 20 de Março de 2017.

Ferguson, L. R. (2010). Meat and cancer. *Meat Science*, 84, 308-313.

Ferreira, S. L. C. (2015). Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos (1ª ed.). Salvador: Vento Leste.

Ferreira^a, M. M. C. (2015). Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações. 1ª ed. Editora da Unicamp.

Ferreira, S. L. C., dos Anjos, J. P., Felix, C. S. A., Junior, M. M. S., Palacio, E., Cerdà, V. (2019). Speciation analysis of antimony in environmental samples employing atomic fluorescence spectrometry – Review. *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 335-343.

Ferreira, S. L. C., Lemos, V. A., de Carvalho, V. S., da Silva, E. G. P., Queiroz, A. F. S., Felix, C. S. A., da Silva, D. L. F., Dourado, G. B., Oliveira, R. V. (2018). Multivariate optimization techniques in analytical chemistry – an overview. *Microchemical Journal*, 140, 176-182.

Food Chemical Codex – FCC SI N° 35 de 1980. Emulsifiers, stabilisers, thickening and gelling agents in food. Regulations, IV Edition, 1980.

Gałuszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical principles. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78 – 84.

Gidenne, T., Garreau, H., Drouilhet, L., Aubert, C., Maertens, L. (2017). Improving feed efficiency in rabbit production, a review on nutritional, technico-economical, genetic and environmental aspects. *Animal Feed Science and Technology*, 225, 109-122.

Giné-Rosias, M. F. (1999). Espectrometria de massas com fonte de plasma. Piracicaba: CENA, 1999. p. 118.

Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L., Maggio, R. M. (2018). 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*, 72, 83-90.

Hu, Y., Zhang, W., Chen, G., Cheng, H., Tao, S. (2018). Public health risk of trace metals in fresh chicken meat products on the food markets of a major production region in southern China. *Environmental Pollution*, 234, 667-676.

Huber, C. S., Vale, M. G. R., Dessuy, M. B., Svoboda, M., Musil, S., Dědina, J. (2017). Sample preparation for arsenic speciation analysis in baby food by generation of substituted arsines with atomic absorption spectrometry detection. *Talanta*, 175, 406-412.

IARC – International Agency for Research on Cancer. (2015). IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. Disponível em: <https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf> Acesso em: 23 de Julho de 2018.

IARC – International Agency for Research on Cancer. (2018). Agents classified by the IARC monographs, volumes 1 – 122. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>> Acesso em: 23 de Julho de 2018.

IARC – International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs – 100C. Arsenic and arsenic compounds (2012). Available in <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100C-6.pdf>> Access in January 04, 2019.

IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry (1978). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-III. Analytical flame spectroscopy and associated non-flame procedures. *Spectrochimica Acta Part B*, 33, 247 – 249.

Jandrić, Z., Cannavan, A. (2017). An investigate study on differentiation of citrus fruit / fruit juices by UPLC-QToF MS and chemometrics. *Food Control*, 72, Part B, 173-180.

Jeszka-Skowron. M., Zgoła-Grzeškowiak. A., Stanitz. E., Waškiewicz. A. (2017). Potential health benefits and quality of dried fruits: Goji fruits, cranberries and raisins. *Food Chemistry*, 221, 228-236.

Junior, M. M. S., Portugal, L. A., Serra, A. M., Ferrer, L., Cerdà, V., Ferreira, S. L. C. (2017). On line automated system for the determination of Sb(V), Sb(III), trimethyl antimony(V) and total antimony in soil employing multisyringe flow injection analysis coupled to HG-AFS. *Talanta*, 165, 502-507.

Kelly, D. G., White, S. D., Weir, R. D. (2013). Elemental composition of dog foods using nitric acid and simulated gastric digestions. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 568-577.

Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., Oh, D-H. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. *Food Control*, 73, 1426-1444.

Khanam, A., Platel, K. (2016). Bioaccessibility of selenium, selenomethionine and selenocysteine from foods influence of heat processing on the same. *Food Chemistry*, 194, 1293-1299.

Kibblewhite, M. G. (2018). Contamination of agricultural soil by urban and peri-urban highways: An overlooked priority? *Environmental Pollution*, 242, 1331-1336.

Kiss, T., Enyedy, E. A., Jakusch, T. (2017). Development of the application of speciation in chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*, 352, 401-423.

Krug, F. J. (2008). Métodos de prepare de amostras – Fundamentos sobre prepare de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1^a ed., Piracicaba, 2008.

Kumar, A. R., Riyazuddin, P. (2010). Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 2, 166-176.

Kumar, B. S., Priyadarsini, K. I. (2014). Selenium nutrition: How important is it? *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4, 333-341.

Kumar, N., Bansal, A., Sarma, G. S., Rawal, R. K. (2014). Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. *Talanta*, 123, 196 – 199.

Kwok, C. K., Liang, Y., Wang, H., Dong, Y. H., Leung, S. Y., Wong, M. H. (2014). Bioaccumulation of heavy metals in fish and Ardeid at Pearl River Estuary, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 62-67.

Li, S., Zeng, W., Li, R., Hoffman, L., He, Z., Sun, Q., Li, H. (2018). Rabbit meat production and processing in China. *Meat Science*, 145, 320-328.

Li, W., Simmons, P., Shrader, D., Herrman, T. J., Dai, S. Y. (2013). Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta*, 112, 43-48.

Lima, D. C., dos Santos, A. M. P., Araujo, R. G. O., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., Ferreira, S. L. C. (2010). Principal component analysis and hierarchical cluster analysis for homogeneity evaluation during the preparation of a wheat flour laboratory reference material for inorganic analysis. *Microchemical Journal*, 95, 222-226.

Lopes, W. L., Santeli, R. E., Oliveira, E. P., Carvalho, M. F. B., Bezerra, M. A. (2009). Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bio-available concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. *Microchemical Journal*, 91, 153-158.

Marín, S., Pardo, O., Sánchez, A., Sanchis, Y., Vélez, D., Devesa, C., Font, G. Yusà, V. (2018). Assessment of metal levels in foodstuffs from the Region of Valencia (Spain). *Toxicology Reports*, 5, 654-670.

Medeiros, R. J., dos Santos, L. M. G., Gonçalves, J. M., Braga, A. M. C. B., Krauss, T. M., Jacob, S. C. (2014). Comparison of the nutritional and toxicological reference values of trace elements in edible marine fish species

consumed by the population in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicology Reports*, 1, 353-359.

Mermet, J. M. (1991). Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. *Analytica Chimica Acta*, 250, 85 – 94.

Mester, Z., Sturgeon, R. (2003). Sample preparation for trace element analysis. Volume 41. ISBN 0-444-51101-6.

Milani, R. F., Morgano, M. A., Cadore, S. (2016). Trace elements in *Camellia sinensis* marketed in southeastern Brazil: Extraction from tea leaves to beverages and dietary exposure. *LWT – Food Science and Technology*, 68, 491-498.

Millour, S., Noël, L., Kadar, A., Chekri, R., Vastel, C., Sirot, V., Leblanc, J. C., Guérin, T. (2011). Pb, Hs, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French total diet study. *Food Chemistry*, 126, 1787-1799.

Mitra, S. (2003). Sample preparation techniques in Analytical Chemistry. Volume 162. ISBN 0-471-32845-6.

Momen, A. A., Zachariadis, G. A., Anthemidis, A. N., Stratis, J. A. (2007). Use of fractional factorial design for optimization of digestion procedures followed by multi-element determination of essential and non-essential elements in nuts using ICP OES technique. *Talanta*, 71, 443 – 451.

Montaser, A., Golightly, D. W. (1992). Inductively Coupled Plasmas in Analytical Spectrometry, WCH Publishers, Inc. New York, United States of América, 1117 p.

Moreira. L. S., Chagas. B. C., Pacheco. C. S. V., Santos. H. M., de Menezes. L. H. S., Nascimento. M. M., Batista. M. A. S., de Jesus. R. M., Amorim. F. A. C., Santos. L. N., da Silva. E. G. P. (2019). Development of procedure for sample preparation of cashew nuts using mixture design and evaluation of nutrient profiles by Kohonen neural network. *Food Chemistry*, 273, 136-143.

Morgano, M. A., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Miyagusku, L., Balian, S. C. (2011). Assessment of trace elements in fishes of Japanese foods marketed in São Paulo (Brazil). *Food Control*, 22, 778-785.

Muller, E. I., Souza, J. P., Muller, C. C., Muller, A. L. H., Mello, P. A., Bizzi, C. A. (2016). Microwave-assisted wet digestion with H₂O₂ at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. *Talanta*, 156-157, 232-238.

Nechar, M., Molina, M. F., Bosque-Sendra, J. M. (1999). Application of Doehlert optimization and factorial designs in developing and validating a solid-phase spectrophotometric determination of trace levels of cadmium. *Analytica Chimica Acta*, 382, 117-130.

Nerín, C., Aznar, M., Carrizo, D. (2016). Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 63-68.

Neto, B. B., Sacrminio, I.S., Bruns, R. E. (2010). Como fazer experimentos. 4^a ed., Editora da Unicamp.

Neves, R. C. F., Moraes, P. M., Saleh, M. A. D., Loureiro, V. R., Silva, F. A., Barros, M. M., Padilha, C. C. F., Jorge, S. M. A., Padilha, P. M. (2009). FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, 113, 679-683.

Noël, L., Chekri, R., Millour, S., Merlo, M., Leblanc, J. C., Guérin, T. (2013). Distribution and relationships of As, Cd, Pb and Hg in freshwater fish from five French fishing areas. *Chemosphere* 90, 1900 – 1910.

Noël, L., Chekri, R., Millour, S., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V., Leblanc, J. C., Guérin. (2012). Li, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se and Mo levels in foodstuffs from the Second French TDS. *Food Chemistry*, 132, 1502-1513.

Nogueira, F. S., Ferreira, K. S., Carneiro Junior, J. B., Passoni, L. C. (2009). Minerals in sugar cane syrup and cane juice. *Food Science and Technology (Campinas)*, 29 (4), 727 – 731.

Novaes, C. G., Bezerra, M. A., Silva, E. G. P., Romão, I. L. S., Neto, J. H. S. (2016). A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). *Microchemical Journal*, 128, 331 – 346.

Novaes. C. G., Ferreira. S. L. C., Neto. J. H. S., de Santana. F. A., Portugal. L. A., Goicoechea. H. C. (2016). A multiple response function for optimization of analytical strategies involving multi-elemental determination. *Current Analytical Chemistry*, 12, 94-101.

NRC^a – National Research Council (1977). Nutrient Requirements of Rabbits. Second Revised Edition, 1977. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/35>

NRC^b - National Research Council (1994). Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/2114>

NRC^c - National Research Council (2007). Nutrient Requirements of Horses: Sixth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11653>

NRC^d - National Research Council (2011). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/13039>

NRC^e - National Research Council (2016). National Academies os Sciences, Engineering, and Medicine, 2016. Nutrient Requirements of Beef Cattle: Eighth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/19014>

Ojeda, C. B., Rojas, F. S. (2007). Determination of rhodium: Since the origins until today ICP-OES and ICP-MS. *Talanta*, 71, 1-12.

Oliveira, J. A. N., Siqueira, L. M. C., Neto, J. A. S., Coelho, N. M. M., Alves, V. N. (2017). Preconcentration system for determination of lead in chicken feed

using *Moringa oleífera* husks as a biosorbent. *Microchemical Journal*, 133, 327-332.

OMS – Organização Mundial da Saúde (2014). Initiative to estimate the global burden of foodborne diseases: Information and publications. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/> Acesso em: 22 de Março de 2017.

OPAS – Organização Panamericana de Saúde (2015). Segurança alimentar é tema do Dia Mundial da Saúde 2015. Disponível em: <http://www.paho.org/bireme/index.php?id=281%3Aseguranca-alimentar-e-tema-do-dia-mundial-da-saude-2015&option=com_content> Acesso em: 22 de Março de 2017.

Parekh. P. P., Khan. A. R., Torres. M. A., Kitto. M. E. (2008). Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 332-335.

Paßlack, N., Mainzer, B., Lahrssen-Wiederholt, M., Schafft, H., Palavinskas, R., Breithaupt, A., Neumann, K., Zentek, J. (2014). Concentrations of strontium, barium, cadmium, copper, zinc, manganese, chromium, antimony, selenium and lead in the equine liver and kidneys. *SpringlerPlus*, 3, 343.

Pérez, M. B., Maniero, M. Á., Londonio, A., Smichowski, P., Wuilloud, R. G. (2018). Effects of common cooking heat treatments on selenium content and speciation in garlic. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 54-62.

Portugal, L. A., Ferrer, L., Serra, A. M., da Silva, D. G., Ferreira, S. L. C., Cerdà, V. (2015). A non-chromatographic automated system for antimony speciation in natural water exploiting multisyringe flow injection analysis coupled with online hydride generation – atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30, 1133-1141.

Psoma, A. K., Pasiás, I. N., Rousis, N. I., Barkonikos, K. A., Thomaidis, N. S. (2014). Development, validation and accreditation of a method for the

determination of Pb, Cd, Cu and As in seafood and fish feed samples. *Food Chemistry*, 151, 72-78.

Rabadán. A., Álvarez-Ortí. M., Gómez. R., Pardo-Giménez. A., Pardo. J. E. (2018). Characterization of pistachio oils and defatted flours regarding cultivar and geographical origin. *Journal of Food Composition and Analysis* 71, 56-64.

Ramasubramanian, T., Paramasivam, M., Jayanthi, R., Chandrasekaran, S. (2014). A simple and sensitive single-step method for gas chromatography-mass spectrometric determination of fipronil and its metabolites in sugarcane juice, jiggery and sugar. *Food Chemistry*, 150, 408 – 413.

Reinholds, I., Bartkevics, V., Silvis, I. C. J., van Ruth, S. M., Esslinger, S. (2015). Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 56 – 72.

Reino Unido (2009). Food Standard Agency. The Food Safety Act 1990 – A Guide for Food Business, 2009 Edition.

Ruttens, A., Cheyns, K., Blanpain, A. C., De Temmerman, L., Waegeneers, N. (2018). Arsenic speciation in food in Belgium. Part 2: Cereals and cereals products. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 32-41.

Saha, N., Rahman, M. S. (2018). Multivariate statistical analysis of metal contamination in surface water around Dhaka export processing industrial zone, Bangladesh. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 10, 206-211.

Saleh, M. A. D., Berto, D. A., Padilha, P. M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of Na and K from swine feed and its application in a digestibility assay: A green analytical procedure. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1353-1358.

Saleh, M. A. D., Neves, R. C. F., Moraes, P. M., Lima, P. M., dos Santos, F. A., Silva, F. A. (2009). Iron determination by FAAS in fish feed and feces after

ultrasound-assisted extraction. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3, 108-113.

Saleh, M. A. D., Padilha, P. M., Hauptli, L., Berto, D. A. (2015). The ultrasonication of minerals in swine feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1):32.

Sales, J., & Janssens, G. P. J. (2003). Nutrients requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources*, 16, 533-540.

Santos, D. C. M. B., Carvalho, L. S. B.; Lima, D. C., Leão, D. J., Teixeira, L. S. G., Korn, M. G. A. (2014). Determination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP OES after ultrasound-assisted extraction procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34, 75 – 80.

Santos, H. M., Coutinho, J. P., Amorim, F. A. C., Lôbo, I. P., Moreira, L. S., Nascimento, M. M., de Jesus, R. M. (2019). Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. *Food Chemistry*, 273, 159-165.

Saucedo-Velez, A. A., Hinojosa-Reyes, L., Villanueva-Rodríguez, M., Caballero-Quintero, A., Hernández-Ramírez, A., Guzmán-mar, J. L. (2017). Speciation analysis of organoarsenic compounds in livestock feed by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, 232, 493-500.

Sauder, K. A., McCrea, C. E., Ulbrecht, J. S., Kris-Etherton, P. M., West, S. G. (2015). Effects of pistachios on the lipid/lipoprotein profile, glycemic control, inflammation, and endothelial function in type 2 diabetes: A randomized trial. *Metabolism Clinical and Experimental*, 64, 1521-1529.

Schiavo, D., Trevizan, L. C., Filo, E. R. P., Nóbrega, J. A. (2009). Evaluation of the use multiple lines for determination of metals in water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial viewing. *Spectrochimica Acta Part B*, 64, 544-548.

Schöne, F., Steinhöfel, O., Weigl, K., Bergmann, H., Herzog, E., Dunkel, S., Kirmse, R., Leiterer, M. (2013). Selenium in feedstuffs and rations for dairy cows including a view of the food chain up to the consumer. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 8, 271 – 280.

Serafim, F. A. T., Pereira-Filho, E. R., Franco, D. W. (2016). Chemical data as markers of geographical origins of sugarcane spirits. *Food Chemistry*, 196, 196 – 203.

Serra, A. M., Estela, J. M., Cerdà, V. (2012). A MSFIA system for selenium speciation by atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27, 1858-1862.

Sharaf, M. A., Illman, D. L., Kowalski, B. R. (1986). *Chemometrics*, John Wiley and Sons, New York.

Sharp^a, B. L. (1998). Pneumatic nebulisers and spray chambers for inductively coupled plasma spectrometry. A review, Part 1 Nebulisers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 3, 613 – 652.

Sharp^b, B. L. (1998). Pneumatic nebulisers and spray chambers for inductively coupled plasma spectrometry. A review, Part 2. Spray chambers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 3, 939 – 963.

Sigrist, M., Hilbe, N., Brusa, L., Campagnoli, D., Beldoménico, H. (2016). Total arsenic in selected food samples from Argentina: Estimation of their contribution to inorganic arsenic dietary intake. *Food Chemistry*, 210, 96-101.

Silva Junior, E. C., Wadt, L. H. O., Silva, K. E., Lima, R. M. B., Batista, K. D., Guedes, M. C., Carvalho, G. S., Carvalho, T. S., Reis, A. R., Lopes, G., Guilherme, L. R. G. (2017). Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. *Chemosphere*, 188, 650-658.

Silva, L. O. B., da Silva, D. G., Leao, D. J., Matos, G. D., Ferreira, S. L. C. (2012). Slurry Sampling for the determination of mercury in rice using cold vapor atomic absorption spectrometry. *Food Analytical Methods*, 5, 1289-1295.

Sindhu, R., Gnansounou, E., Binod, P., Pandey, A. (2016). Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products - An overview. *Renewable Energy*, 98, 203 – 215.

Škrbić, B., Živančev, J., Mrmoš, N. (2013). Concentrations of arsenic, cadmium and lead in selected foodstuffs from Serbian basket: Estimated intake by the population from the Serbia. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 440-448.

Sousa, R. A., Silva, J. C. J., Baccan, N., Cadore, S. (2005). Determination of metals in bottled coconut water using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 399 – 408.

Souza, A. S., Fernandes, A. P., Araujo, R. G. O., Andrade, R. F., Vinhas, A. C. A. (2017). Screening the geographical origin of Brazilian wines according their elemental composition. *Current Analytical Chemistry*, 13, 6, 515-523.

Souza, S. O., Costa, S. S. L., Santos, D. M., Pinto, J. S., Garcia, C. A. B., Alves, J. P. H., Araujo, R. G. O. (2014). Simultaneous determination of macronutrientes, micronutrientes and trace elements in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 96, 1-7.

Souza, S. O., Santos, V. S., Santos, E. S., Ávila, D. V. L., Nascimento, C. C., Costa, S. S. L., Garcia, C. A. B., Araujo, R. G. O. (2018). Evaluation of the mineral content in milk and yogurt types using chemometric tools. *Microchemical Journal*, 143, 1-8.

Spears, J. W., Lloyd, K. E., Krafka, K. (2017). Chromium concentrations in ruminant feed ingredients. *Journal of Dairy Science*, 100, 5, 3584 – 3590.

Suganthi, A., Bhuvaneshwari, K., Ramya, M. (2018). Determination of neonicotinoid insecticide residues in sugarcane juice using LCMSMS. *Food Chemistry*, 241, 275 – 280.

Sun, H. J., Rathinasabapathi, B., Wu, B., Luo, J., Pu, L. P., Ma, L. Q. (2014). Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environmental International* 69, 148-158.

Szymczycha-Madeja, A., Welna, M. (2013). Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 141, 3466 – 3472.

Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., Jedryczko, D., Pohl, P. (2014). Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices. *Trends in Analytical Chemistry*, 55, 68 – 80.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2011) / NEPA – UNICAMP. 4. Ed. rev. e ampl. – Campinas: NEPA – UNICAMP (2011) 161 p. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf> Acesso em: 10 de Outubro de 2018.

Tai, C. Y., Jiang, S. J., Sahayam, A. C. (2016). Determination of As, Hg and Pb in herbs using slurry sampling flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 192, 274-279.

Takase, I., Pereira, H. B., Luna, A. S., Grinberg, P., de Campos, R. C. (2002). A geração química de vapor em espectrometria atômica. *Química Nova*, 25, 6B, 1132-1144.

Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L. G., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P., Łobiński, R. (2000). IUPAC, International Union for Pure Applied and Chemistry. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry*, 72, 8, 1453-1470.

Templeton, D. M., Fujishiro, H. (2017). Terminology of elemental speciation – An IUPAC perspective. *Coordination Chemistry Reviews*, 352, 424-431.

Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C. (2006). Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, 29, 338 – 250.

Thomas, R. (2008). Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners. 2nd edition. ISBN 978-1-4200-6786-6

Topczewska, J. (2012). Effects of seasons on the concentration of selected trace elements in horse hair. *Journal of Central European Agriculture*, 13, 4, 671 – 680.

Tormen, L., Torres, D. P., Dittert, I. M., Araujo, R. G. O., Frecura, V. L. A., Curtius, A. J. (2011). Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled plasma mass spectrometry after a simple dilution. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 95 – 102.

Trevizan, L. C., Vieira, E. C., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A. (2005). Use of factorial design for evaluation of plasma conditions and comparison of two liquid sample introduction systems for an axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometer. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, 575 – 581.

Trindade, A. S. N., Dantas, A. F., Lima, D. C., Ferreira, S. L. C., Teixeira, L. S. G. (2015). Multivariate optimization of Ultrassound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 185, 145-150.

Tuzen, M., Pekiner, O. Z. (2015). Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometric for selenium speciation in foods and beverages. *Food Chemistry* 188, 619-624.

União Europeia (2014). Comissão Regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 december 2006; No 629/2008 of 2 July 2008 and No 488/2014 of 12 May 2014.

Disponível em: <<http://www.eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=URISERV%3AI21290>> Acesso em: 20 de Março de 2017.

Valdés, A., Beltrán, A., Mellinas, C., Jiménez, A., Garrigós, M. C. (2018). Analytical methods combined with multivariate analysis for authentication of animal and vegetable food products with high fat content. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 120 – 130.

Wang, M., Zhong, Y., Qin, J., Zhang, Z., Li, S., Yang, B. (2017). Determination of total selenium in food samples by d-CPE and HG-AFS. *Food Chemistry*, 227, 329-334.

Wei, Y. H., Zhang, J. Y., Zhang, D. W., Luo, L. G., Tu, T. H. (2014). Simultaneous determination of Se, trace elements and major elements in Se-rich rice by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) after microwave digestion. *Food Chemistry*, 159, 507-511.

Yada. S., Lapsley. K., Huang. G. (2011). A review of consumption studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 469-480.

Yuan. B., Lu. M., Eskridge. K. M., Isom. L. D., Hanna. M. A. (2018). Extraction, identification, and quantification of antioxidant phenolics from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells. *Food Chemistry* 224, 7-15.

Zmozinski, A. V., Llorente-Mirandes, T., Damin, I. C. F., López-Sánchez, J. F., Vale, M. G. R., Welz, B., Silva, M. M. (2015). Direct solid sample analysis with graphite furnace atomic absorption spectrometry – A fast and reliable screening procedure for the determination of inorganic arsenic in fish and seafood. *Talanta*, 134, 224-231.

Zuanon, J. A. S., Salaro, A. L., Furuya, W. M. (2011). Production and nutrition of ornamental fish. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 165-174.

Zuin, V. G., Schellin, M., Montero, L., Yariwake, J. H., Augusto, F., Popp, P. (2006). Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted

solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. *Journal of Chromatography A*, 114, 180 – 187.