

Artigo

Comparação entre Métodos de Solubilização Alcalina e Digestão Ácida de Tecido Animal para Determinação de Metais Usando Espectrometria de Absorção Atômica em Chama

Butik, M.;* Kelte Filho, I; Peres, J. A.; Quináia, S. P.

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (4), no prelo. Data de publicação na Web: 4 de julho de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Comparison between Alkaline Solubilization Methods and Acid Digestion of Animal Tissue for Determination of Metals by Flame Atomic Absorption Spectrometry

Abstract: Usually, the methodologies found in the literature on biological tissue digestion are usually time consuming and use high amounts of reagents. In this study, two methods of preparation of bovine testis samples were evaluated: acid digestion using nitric acid and alkaline solubilization using tetramethylammonium hydroxide. The analytical validation study evaluated the parameters of linearity, limits of detection (acid digestion 0.10; 1.02; 0.16; 0.67 mg kg⁻¹ for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively; alkaline solubilization 0.12; 0.74; 0.16; 0.23 mg kg⁻¹ for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively) and quantification (acid digestion 0.34; 3.40; 0.53; 2.20 mg kg⁻¹ for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively; alkaline solubilization 0.41; 2.50; 0.54; 0.77 mg kg⁻¹ for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively), precision (RSD < 7.3% for repeatability and RSD < 15.0% for intermediary precision) and accuracy, being that the percentage of recovery obtained in the acid digestion of 105.50% (Cu), 103.30% (Fe), 94.90% (Mn) and 89.60% (Zn) and in the alkaline solubilization 100.80% (Cu), 98.70% (Fe), 103.70% (Mn) and 95.70% (Zn), therefore, the two procedures were efficient for this type of matrix. The times required for acid digestion and an alkaline solubilization were 1h30min and 1h, respectively.

Keywords: Animal tissues; sample preparation; metals; atomic absorption.

Resumo

Normalmente, as metodologias encontradas na literatura sobre a digestão dos tecidos biológicos costumam demorar e utilizar grandes quantidades de reagentes. Neste estudo, foram avaliados dois métodos de preparação de amostras de testículo bovino: digestão ácida utilizando ácido nítrico e solubilização alcalina usando hidróxido de tetrametilamônio. O estudo de validação analítica avaliou os parâmetros de linearidade, limites de detecção (digestão ácida 0,10; 1,02; 0,16; 0,67 mg kg⁻¹ para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente; solubilização alcalina 0,12; 0,74; 0,16; 0,23 mg kg⁻¹ para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente) e quantificação (digestão ácida 0,34; 3,40; 0,53; 2,20 mg kg⁻¹ para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente; solubilização alcalina 0,41; 2,50; 0,54; 0,77 mg kg⁻¹ para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente), precisão (RSD < 7,3% para repetitividade e RSD < 15,0% para precisão intermediária) e exatidão, sendo que a porcentagem de recuperação obtidos na digestão ácida foram 105,50% (Cu), 103,30% (Fe), 94,90% (Mn) e 89,60% (Zn) e na solubilização alcalina foram 100,80% (Cu), 98,70% (Fe), 103,70% (Mn) e 95,70% (Zn), portanto, os dois métodos foram eficientes para este tipo de matriz. Os tempos necessários para a digestão ácida e a solubilização alcalina foram de 1h30min e 1h, respectivamente.

Palavras-chave: Tecido animal; preparação de amostra; metais; absorção atômica.

* Universidade Estadual do Centro-Oeste, Departamento de Química, Campus CEDETEG, Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

✉ marianebutik@gmail.com

DOI:

Comparação entre Métodos de Solubilização Alcalina e Digestão Ácida de Tecido Animal para Determinação de Metais Usando Espectrometria de Absorção Atômica em Chama

Mariane Butik,^a Irineo Kelte Filho,^a Jayme Augusto Peres,^b Sueli Pércio Quinária

^a Universidade Estadual do Centro-Oeste, Departamento de Química, Campus CEDETEG, Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 Vila Carli, Guarapuava-PR, 85040-080, Brasil.

^b Universidade Estadual do Centro-Oeste, Departamento de Medicina Veterinária, Campus CEDETEG, Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 Vila Carli, Guarapuava-PR, CEP 85040-080, Brasil.

* marianebutik@gmail.com

Recebido em 19 de março de 2018. Aceito para publicação em 25 de junho de 2018

1. Introdução

2. Metodologia

2.1. Equipamentos, reagentes e amostras

2.2. Avaliação dos procedimentos analíticos para preparo da amostra

2.3. Validação dos métodos para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido animal por FAAS

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação da digestão ácida em tecido animal

3.2. Avaliação da solubilização alcalina do tecido animal

3.3. Validação analítica dos métodos propostos

4. Conclusão

1. Introdução

Elementos essenciais como Fe (ferro), Zn (zinco), Cu (cobre) e Mn (manganês) são espécies químicas utilizadas para manter o bom funcionamento do organismo.¹ Esses metais são importantes devido às suas especificidades quando presentes no organismo em concentrações adequadas.² A

deficiência de metais essenciais pode provocar doenças tais como a anemia, resultante de falta de Fe, e problemas de crescimento e desenvolvimento infantil, relacionados com a falta de Zn.²⁻³ Quando há níveis inadequados desses elementos, o organismo não consegue completar seu ciclo normal ou ter um crescimento saudável, pois necessita da presença desses elementos para exercer suas funções.^{1-2,4-5} No entanto, teores

elevados podem ser prejudiciais, pois com excesso de metais, os mesmos se tornam tóxicos levando ao surgimento de inflamações e cânceres.^{3,6}

Para a determinação de metais em amostras biológicas complexas, como tecidos de animais, normalmente é utilizada a digestão prévia, que é a decomposição da matéria orgânica e a dissolução das espécies inorgânicas de interesse.⁷ Várias técnicas podem ser usadas, como a digestão por via seca (calcinação) e a digestão por via úmida.⁷⁻⁹ A técnica da calcinação apresenta várias desvantagens como, por exemplo, a perda de analitos por volatilização em temperaturas elevadas, contaminações das amostras devido ao tempo prolongado de calcinação (variando de horas à dias), e digestão incompleta da amostra caso o tempo de aquecimento não seja suficiente para a queima de toda a matéria orgânica.⁷ A digestão ácida é muito utilizada, pois elimina a matéria orgânica pelo processo de oxidação com ou sem aquecimento e não exige uma temperatura tão elevada quanto a requerida pela digestão por via seca.^{7,10-11}

Outro recurso que pode ser utilizado no preparo de amostras biológicas é a solubilização alcalina através do uso do Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH). Seu uso surgiu em 1970 para dissolução de materiais biológicos como alternativa à digestão convencional na determinação de compostos inorgânicos, pois solubiliza facilmente a matéria orgânica e gorduras.¹²⁻¹⁶ Seu uso vem sendo empregado no tratamento de várias amostras, como biodiesel, leite em pó, frutos do mar, tecidos de peixe e muitos outros tecidos animais.^{1,12,14,17-18}

Esse trabalho tem como objetivo a avaliação e validação de métodos analíticos de preparo de amostras, como a digestão ácida e a solubilização alcalina, visando a obtenção de procedimentos mais rápidos e com menor consumo de reagentes em relação aos descritos em literatura para a determinação de metais em tecidos biológicos. Esses métodos serão usados na quantificação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em

amostras de testículo bovino, utilizando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS).

2. Metodologia

2.1. Equipamentos, reagentes e amostras

As determinações dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) – Varian, modelo AA 220, equipado com as respectivas lâmpadas de cátodo oco da marca Varian e lâmpada de deutério como corretor de fundo. Os comprimentos de onda utilizados nas medidas foram de 324,7, 248,3, 279,5 e 213,9 nm para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente. As correntes das lâmpadas de cátodo oco foram de 4 mA para Cu e 5 mA para Fe, Mn e Zn, enquanto que as fendas do monocromador foram de 0,5 nm para Cu, 0,2 nm para Fe e Mn e 1,0 nm para Zn. A mistura de gases usados para a determinação de cada metal foi composta de ar/acetileno. Para efetuar as análises, construiu-se a curva analítica com solução padrão estoque de Cu, Fe, Mn e Zn de 1000 mg L⁻¹ (Biotec) com grau de pureza de 99,9%. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura (Gehaka OS 10LX). Também foram utilizados ácido nítrico (HNO₃) (Carlo Erba, 65% v/v), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (BIOTEC 35% m/v) e TMAH (Sigma-Aldrich, 25% m/v). Todos os frascos e vidrarias utilizados foram devidamente descontaminados em banho de ácido nítrico 5% (v/v), por 24h e posteriormente enxaguados com água deionizada.¹⁹ As amostras de testículo bovino saudáveis foram coletadas no Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária da UNICENTRO, após procedimentos cirúrgico de remoção dos testículos, a orquiectomia.²⁰ As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em freezer (-4°C).

2.2. Avaliação dos procedimentos analíticos para preparo da amostra

Os ensaios de preparo de amostras foram avaliados a fim de verificar a eficiência e celeridade dos métodos propostos (digestão ácida e solubilização alcalina). As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, cortadas em fragmentos (~2,0 mm) utilizando faca de aço inoxidável sob uma base de vidro, para evitar

contaminações durante o preparo. Inicialmente, foram avaliados dez ensaios de digestão ácida variando-se alguns parâmetros, os quais estão identificados na Tabela 1. Os parâmetros (volume de reagentes, massa e tempo) avaliados no processo de digestão ácida foram escolhidos com base na quantidade disponível do tecido biológico. Além disso, buscou-se sempre minimizar o volume de reagentes e tempo envolvidos no processo.

Tabela 1. Parâmetros avaliados nos ensaios de digestão ácida de testículo bovino

Ensaio	Massa (g)	Frasco de digestão	HNO ₃ ; H ₂ O ₂ (mL)	Aquecimento (°C)	Tempo (h)
1*	3,0	Béquer (50,0 mL)	20,0; 2,0	Chapa de aquecimento (100°)	4:30
2*	0,5	Béquer (50,0 mL)	20,0; 2,0	Chapa de aquecimento (100°)	4:30
3**	0,5	Tubo criogênico (5,0 mL)	3,0; 1,0	Banho-maria (90°)	2:00
4**	0,5	Tubo criogênico (5,0 mL)	1,5; 0,5	Banho-maria (90°)	2:00
5**	1,25	Tubos Falcon (50,0 mL)	5,0; 2,0	Banho-maria (90°)	2:00
6**	0,5	Tubos Falcon (50,0 mL)	3,0; 1,5	Banho-maria (90°)	2:00
7**	0,1	Tubos Falcon (50,0 mL)	3,0; 1,0	Banho-maria (90°)	2:00
8**	0,3	Tubo de vidro com tampa (10,0 mL)	2,0; 1,0	Bloco digestor	1:30
9**	0,3	Tubo de vidro com ponteira (10,0 mL)	2,0; 0,0	Bloco digestor	1:30
10**	0,5	Tubo de vidro com ponteira (10,0 mL)	2,0; 0,0	Bloco digestor	1:30

Diluição final das amostras: * 25 mL; **10 mL

Para o aquecimento em bloco digestor, utilizou-se uma rampa contendo 3 etapas: na primeira etapa partiu-se da temperatura ambiente (25 °C) até 90 °C (~45 min), permanecendo nesta temperatura por mais 5 min. Na sequência, aumentou-se para 100 °C a temperatura do bloco digestor, o qual necessitou de 10 min para atingir este patamar, permanecendo por mais 5 min a 100°C. Por último, a temperatura foi elevada para 130 °C (em ~20 min), permanecendo também por mais 5 min nesta temperatura. O tempo total do processo de digestão foi de

1h30min.

Para a solubilização alcalina do tecido bovino, foram realizados três ensaios variando-se a massa da amostra, o volume de reagente (TMAH), a temperatura e o recipiente para o processo de solubilização, os quais são apresentados na Tabela 2. No ensaio 1 os parâmetros foram selecionados com base na literatura,¹ os ensaios 2 e 3 foram sendo adaptados, buscando sempre minimizar massa da amostra e tempo envolvidos na solubilização.

Tabela 2. Procedimentos avaliados na solubilização alcalina de testículo bovino

Ensaio	Massa (g)	Frasco de digestão	TMAH; H ₂ O (mL)	Aquecimento (°C)	Tempo (h)
1*	0,5	Tubo Falcon (50 mL)	1,0; 0,0	Ambiente	2
2*	0,5	Tubo Falcon (50 mL)	1,0; 0,5	Banho Maria (50°)	1
3*	0,3	Tubo de vidro com ponteira (10,0 mL)	1,0; 0,5	Bloco digestor (60°)	1

* Diluição final das amostras: 10 mL

2.3. Validação dos métodos para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido animal por FAAS

A validação das metodologias propostas para as determinações dos metais nas amostras de tecido animal foi avaliada através dos parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

As curvas analíticas envolvendo a solubilização alcalina foram realizadas com padrão externo na presença e na ausência de TMAH para avaliar interferências. Para a digestão ácida utilizou-se curvas analíticas externa aquosa. As curvas analíticas foram feitas em triplicata para Cu, Fe, Mn e Zn utilizando faixas de concentração de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, 0,2; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹, 0,1; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ e 0,1; 0,2;

0,3; 0,4 e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente. A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através da análise de regressão linear e do teste de falta de ajuste, no nível de confiança de 95%. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pelas equações LD= 3,3Sb/B e LQ= 10Sb/B, onde Sb é o desvio padrão de dez leituras do branco e B é a inclinação da curva analítica, de acordo com o ICH.²¹ A precisão do método foi avaliada através do estudo de repetitividade em triplicata e pela precisão intermediária realizada em três dias diferentes de acordo com a AOAC.²² Como as concentrações de Cu e Mn nas amostras eram próximas ao LQ, foi necessário fazer uma fortificação nas mesmas de 0,5 mg L⁻¹ para os estudos de repetitividade e precisão intermediária. A exatidão foi avaliada através de estudos de adição e recuperação de metais sobre as amostras em dois níveis de concentrações

conhecidas de cada metal de interesse (0,5 e 1,0 mg L⁻¹ para Cu, Fe e Mn, e 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ para Zn).²³ Toda a análise estatística aplicada foi realizada no nível de 95% de confiança utilizando o *software* Action Free, versão 2.7.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação da digestão ácida em tecido animal

Tabela 3. Recuperação de íons metálicos (1,0 mg L⁻¹) em testículo bovino após processos de digestão ácida (n = 3) por FAAS

Ensaio	Recuperação (%)			
	Cu	Fe	Mn	Zn
1	25,00 ± 0,02	12,00 ± 0,01	ND	18,00 ± 0,01
2	ND	5,00 ± 0,08	ND	11,00 ± 0,08
3	10,00 ± 0,05	ND	ND	ND
4	66,00 ± 0,05	58,00 ± 0,04	45,00 ± 0,06	70,00 ± 0,05
5	81,00 ± 0,02	61,00 ± 0,05	57,00 ± 0,07	67,00 ± 0,02
6	95,00 ± 0,01	83,00 ± 0,03	67,00 ± 0,04	67,00 ± 0,05
7	103,00 ± 0,03	76,00 ± 0,08	69,0 ± 0,1	82,00 ± 0,01
8	125,00 ± 0,06	119,00 ± 0,02	137,00 ± 0,01	150,0 ± 0,1
9	107,40 ± 0,01	100,60 ± 0,07	108,00 ± 0,01	100,50 ± 0,02
10	105,20 ± 0,01	105,30 ± 0,02	102,20 ± 0,04	97,00 ± 0,01

ND- não detectado.

O ensaio 1 apresentou valores de recuperações baixos para os metais Cu, Fe e Zn, enquanto que para o Mn não se obteve recuperação. Provavelmente, a digestão em sistema aberto, com uma massa elevada de amostra (3,0 g) e aquecimento em chapa, não proporcionou uma condição adequada para a digestão. No ensaio 2, diminui-se a massa da amostra (0,5 g) a fim de melhorar o processo de digestão, porém as recuperações foram insatisfatórias como no ensaio 1. Observou-se que a digestão prolongada (~

Neste trabalho, foram avaliados diferentes ensaios de digestão ácida (Tabela 1) de amostras de testículo bovino dopadas com 1,0 mg L⁻¹ de Cu, Fe, Mn e Zn com o propósito de diminuir contaminações e perdas dos analitos, utilizando menores quantidades de reagentes e menor tempo de digestão. Os valores de recuperação estão apresentados na Tabela 3.

4h30min) e o uso de grandes volumes de reagentes (20,0 mL de HNO₃ e 2,0 mL de H₂O₂) foram os motivos dos resultados insatisfatórios, além disso, sugere-se que a chapa de aquecimento não proporcionou um aquecimento homogêneo no meio de digestão. Uma nova tentativa de digestão foi avaliada no ensaio 3, usando frasco fechado e de menor volume (tubos criogênicos 5,0 mL) para evitar contaminações e/ou perda dos analitos. Foram usadas menores quantidades de massa de amostra e de reagentes (0,5 g;

3,0 mL de HNO_3 e 1,0 mL de H_2O_2) sob aquecimento em banho-maria durante 2h a 90 °C. As recuperações desse procedimento também não foram promissoras, pois o tubo era pequeno para o volume dos reagentes usados. Mesmo com o tubo fechado o material da digestão efervesce com a adição do H_2O_2 e ocorria perda de material através da rosca da tampa do tubo. A recuperação foi baixa para Cu (10,00%) e nenhum sinal foi detectado para o Fe, Mn e Zn.

Para tentar evitar a perda do digerido por efervescência, no ensaio 4, foram reduzidos os volumes de reagentes pela metade em comparação ao ensaio 3 (1,5 mL de HNO_3 e 0,5 mL de H_2O_2). As recuperações para Cu, Fe, Mn e Zn foram 66,00% ($\pm 0,05$), 58,00% ($\pm 0,04$), 45,00% ($\pm 0,06$) e 70,00% ($\pm 0,05$), respectivamente, melhores que no ensaio 3, mas ainda não foram adequadas, pois observou-se partículas das amostras não digeridas aderidas na tampa e na parede do tubo e ainda perdas do digerido por causa da efervescência através da tampa. Em seguida, testou-se o ensaio 5 com tubos maiores (Falcon, 50,0 mL) para evitar a perda de material durante a efervescência. Como o tubo Falcon era maior, aumentou-se a massa das amostras para 1,25 g a fim de aumentar a concentração dos elementos determinados, e aumentou-se também os volumes de HNO_3 e H_2O_2 para 5,0 mL e 2,0 mL, respectivamente. O digerido apresentou uma aparência mais límpida, com menos partículas não digeridas na parede do tubo e aumento dos valores de recuperação em relação aos ensaios anteriores, principalmente para Cu que teve uma recuperação de 81,00% ($\pm 0,02$), porém para os demais metais as recuperações ainda não foram satisfatórias.

Para tentar minimizar ainda mais as perdas de amostras por efervescência e melhorar a digestão, foi avaliado o ensaio 6 (0,5 g, 3,0 mL de HNO_3 e 1,5 mL de H_2O_2) diminuindo a massa e os volumes de reagentes em comparação com o ensaio 5. As recuperações dos metais Cu, Fe, Mn e Zn para o ensaio 6 foram de 95,00% ($\pm 0,01$), 83,00% ($\pm 0,03$), 67,00% ($\pm 0,04$) e 67,00% ($\pm 0,05$), respectivamente, indicando melhora

na liberação de Cu e Fe da matéria orgânica, porém não sendo adequado para Mn e Zn. Por fim testou-se o ensaio 7 (0,1 g, 3,0 mL de HNO_3 e 1,0 mL de H_2O_2) diminuindo ainda mais a massa de amostra na tentativa de obter uma digestão completa, sem sobras de partículas nas paredes do tubo e reduzindo o volume de H_2O_2 o qual gerava a efervescência do meio. As recuperações foram de 103,00% ($\pm 0,03$), 76,00% ($\pm 0,08$), 69,0% ($\pm 0,1$) e 82,00% ($\pm 0,01$) para os metais Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente, indicando boa recuperação para Cu e Zn.

Avaliando-se os sete ensaios, observou-se que nenhum deles gerava recuperações acima de 80% para todos os metais em um mesmo ensaio. Portanto, outra estratégia foi usada, empregando-se a digestão do tecido animal em bloco digestor onde a temperatura poderia ser aumentada e controlada. Nos ensaios 8 a 10, utilizou-se rampa de aquecimento (90,0 °C, 100,0 °C e 130,0 °C) para que a temperatura não subisse rapidamente, evitando assim a efervescência brusca do meio e perdas de amostra. No ensaio 8, observou-se que a digestão foi completa, porém com a adição do H_2O_2 ocorria a efervescência e o material digerido atingia a tampa do tubo de ensaio. Os resultados desse ensaio não foram confiáveis, pois os valores das concentrações foram maiores do que o esperado indicando contaminação da amostra, principalmente para o Zn, onde a recuperação foi de 150,0% ($\pm 0,1$) (Tabela 3). Como toda a vidraria era previamente descontaminada, suspeitou-se da possibilidade das tampas dos tubos de ensaio serem a fonte de contaminação durante o processo de digestão. Essa suspeita foi confirmada após a determinação de Zn em “brancos” analíticos oriundos de tubos de ensaio fechados com as tampas próprias e de “brancos” provenientes de tubos isentos de suas tampas. O teor de Zn nos brancos digeridos com as tampas foi da ordem de 1,59 mg L⁻¹, enquanto que os brancos dos tubos isentos das tampas apresentaram sinais abaixo do LD do método analítico. Desta forma, substituíram-se as tampas plásticas dos tubos de ensaio por ponteiros de micropipetas durante o processo de

digestão das amostras (ensaios 9 e 10) como apresentado em artigo publicado anteriormente.²⁴ As ponteiras (diâmetro de 1,0 cm) se encaixaram perfeitamente na boca do tubo de vidro e seu pequeno orifício na ponta permitiu a saída de vapor ácido durante a digestão. Nos ensaios 9 e 10, variou-se a massa da amostra de testículo bovino de 0,3 g para 0,5 g para verificar se o procedimento era viável com massas maiores e eliminou-se a introdução de H₂O₂ do meio de digestão. No ensaio 9, as recuperações para Cu, Fe, Mn e Zn foram de 107,40 (± 0,01), 100,60 (± 0,07), 108,00 (± 0,01) e 100,50% (± 0,02), respectivamente, enquanto que, para o procedimento 10 foram de 105,20 (± 0,01), 105,30 (± 0,02), 102,20 (± 0,04) e 97,00% (± 0,01) para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente. Os dois ensaios apresentaram recuperações adequadas independente da massa de amostra digerida (Tabela 3).

O ensaio 9, proposto nesse trabalho, apresentou adequada recuperação para todos os metais estudados. Além de ser um procedimento simples e de necessitar de um equipamento de baixo custo para a digestão (bloco digestor), o tempo de digestão foi relativamente curto (~1h30min) e o volume de HNO₃ (2,0 mL) foi pequeno quando comparado às outras metodologias descritas na literatura.²⁵⁻²⁷ Nunes *et al.*²⁵ determinaram Ca, Cu, Fe e Mg em 0,5 g de carne usando 5,0 mL de HNO₃ concentrado e aquecimento em bloco digestor por 90 °C. Após 1 h de digestão, adicionaram-se mais 2,0 mL H₂O₂ e aqueceram-se a 90 °C por mais 1 h para finalizar o processo. Cerulli *et al.*²⁶ determinaram Cd, Cu, Pb e Zn em amostras de rins neoplásicos utilizando diferentes massas de amostra (0,3 a 3,0 g). As amostras foram deixadas em contato com HNO₃ concentrado por uma noite, após adicionaram-se H₂O₂ e completaram a digestão em forno micro-ondas. Tizioto *et al.*²⁷ determinaram Ca e K em carne bovina utilizando os seguintes parâmetros: 0,1 g de amostra, 2,0 mL de HNO₃, 2,0 mL de H₂O₂ e

6,0 mL de água ultrapura. A digestão foi realizada em reservatório fechado de forno micro-ondas utilizando-se rampa de aquecimento: (1) 10 min com temperatura máxima de 120°C, (2) 15 min com temperatura máxima de 170 °C e (3) 170 °C durante 35 min.

3.2. Avaliação da solubilização alcalina do tecido animal

O método de digestão ácida foi adequado, pois apresentou recuperações próximas de 100% para os metais avaliados, no entanto, a fim de buscar maior frequência analítica optou-se por avaliar a solubilização alcalina que é um método que exige menor temperatura, menor tempo de solubilização, além de reduzir com eficiência a gordura dos tecidos animais.¹

Três ensaios de solubilização alcalina com TMAH foram avaliados, sempre com o objetivo de acelerar a rotina das análises químicas. Os valores de recuperação dos ensaios estão apresentados na Tabela 4.

No ensaio 1 foram utilizados tubos Falcon (50,0 mL) em temperatura ambiente por 2h. As recuperações desse ensaio não foram satisfatórias, sendo de 72,00% (± 0,01) para o Cu e de 80,00% (± 0,02) para o Zn, Fe e Mn nem chegaram a ser quantificados, devido a observação visual da presença de inúmeras partículas do tecido animal em suspensão, indicando que a liberação dos metais em solução não foram eficientes. Para o ensaio 2, foi acrescentado 0,5 mL de H₂O para melhorar o contato da solução de TMAH com a amostra de testículo bovino, e os tubos foram aquecidos em banho-maria para acelerar a solubilização. As recuperações desse procedimento também não foram satisfatórias, sendo de 74,00% (± 0,03) para o Cu, de 76,00% (± 0,05) para o Fe, de 63,00% (± 0,07) para o Mn e de 69,00% (± 0,09) para o Zn.

Tabela 4. Recuperação de íons metálicos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em testículo bovino após aplicação dos ensaios 1, 2 e 3 com solubilização alcalina ($n = 3$) por FAAS

Metal	Recuperação (%)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Cu	72,00 ± 0,01	74,00 ± 0,03	101,00 ± 0,06
Fe	*	76,00 ± 0,05	102,00 ± 0,02
Mn	*	63,00 ± 0,07	101,00 ± 0,01
Zn	80,00 ± 0,02	69,00 ± 0,09	99,00 ± 0,05

* Não foi medido

Um terceiro ensaio de solubilização alcalina foi testado empregando-se o bloco digestor e tubos de vidros (10,0 mL) tampados com ponteiros de micropipetas. Observou-se que nesse ensaio a solubilização alcalina conseguiu eliminar toda a gordura da amostra, pois não foi observada formação de gotículas de gordura após o resfriamento da suspensão em temperatura ambiente. Mesmo sendo uma suspensão, a matéria orgânica restante da solubilização alcalina é eliminada durante a atomização no espectrômetro de absorção atômica.¹⁸ Com a temperatura controlada no bloco digestor (60 °C) a solubilização é acelerada e não ocorre volatilização dos analitos.²⁸ O uso de pequeno volume de TMAH (com pureza elevada), proporcionam “brancos” adequados, diminuindo assim os valores do limite de detecção do analito na determinação.²⁹ A utilização da água acompanhado de TMAH, ajudou na hidratação do meio permitindo que o reagente penetrasse mais facilmente na matriz, liberando as espécies metálicas.¹⁴ As recuperações foram adequadas sendo de 101,00 (± 0,06), 102,00 (± 0,02), 101,00 (± 0,01) e 99,00% (± 0,05) para os metais Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente. Portanto, o procedimento utilizado para a validação do método de preparo de amostras por solubilização alcalina foi o ensaio 3, o qual apresentou excelentes recuperações ficando dentro da faixa de recuperação adequada que é de 80 a 110% segundo a AOAC.²²

Comparando o ensaio 3 com alguns métodos descritos na literatura, sobre

a solubilização alcalina utilizando TMAH, pode-se observar que o procedimento proposto nesse trabalho apresentou boa recuperação para todos os metais estudados, com tempo de solubilização relativamente curto (~ 1h), além de ser um procedimento simples, quando comparado às outras metodologias propostas na literatura.^{1,30}

Nunes *et al.*¹, determinaram Fe, Mg, Mn, P e Zn em amostras de carnes utilizando 1 g de amostra com 1,25 mL de TMAH (25% m/v). A solubilização alcalina ocorreu a temperatura ambiente, entre 2 a 3h e as recuperações obtidas usando este procedimento foram de 85% a 118%. Batista *et al.*³⁰, determinaram elementos traços em tecidos biológicos utilizando 0,75 g de cada amostra com 1,0 mL de TMAH (50% v/v) à temperatura ambiente durante 12h em um homogeneizador rotacional, concluindo que a solubilização alcalina foi adequada quando comparada com o método de digestão ácida via micro-ondas.

Comparando-se os dois métodos avaliados e propostos nesse trabalho, a digestão ácida (ensaio 9) e a solubilização alcalina (ensaio 3), pode-se comprovar que a solubilização alcalina necessitou de menor volume de reagente (1,0 mL de TMAH, 25% m/v), menor temperatura (60 °C) e menor tempo (1h), o que torna muito vantajosa a utilização do TMAH no pré-tratamento de tecidos biológicos para determinação de espécies metálicas por FAAS.

3.3. Validação analítica dos métodos propostos

Curvas analíticas para os metais Cu, Fe, Mn e Zn com e sem TMAH foram realizadas a fim de verificar se o reagente

poderia interferir na quantificação dos metais, devido a sua viscosidade, durante a aspiração pelo capilar do equipamento de absorção atômica em chama. Na Figura 1 são apresentadas as curvas analíticas para todos os metais na presença e ausência de TMAH.

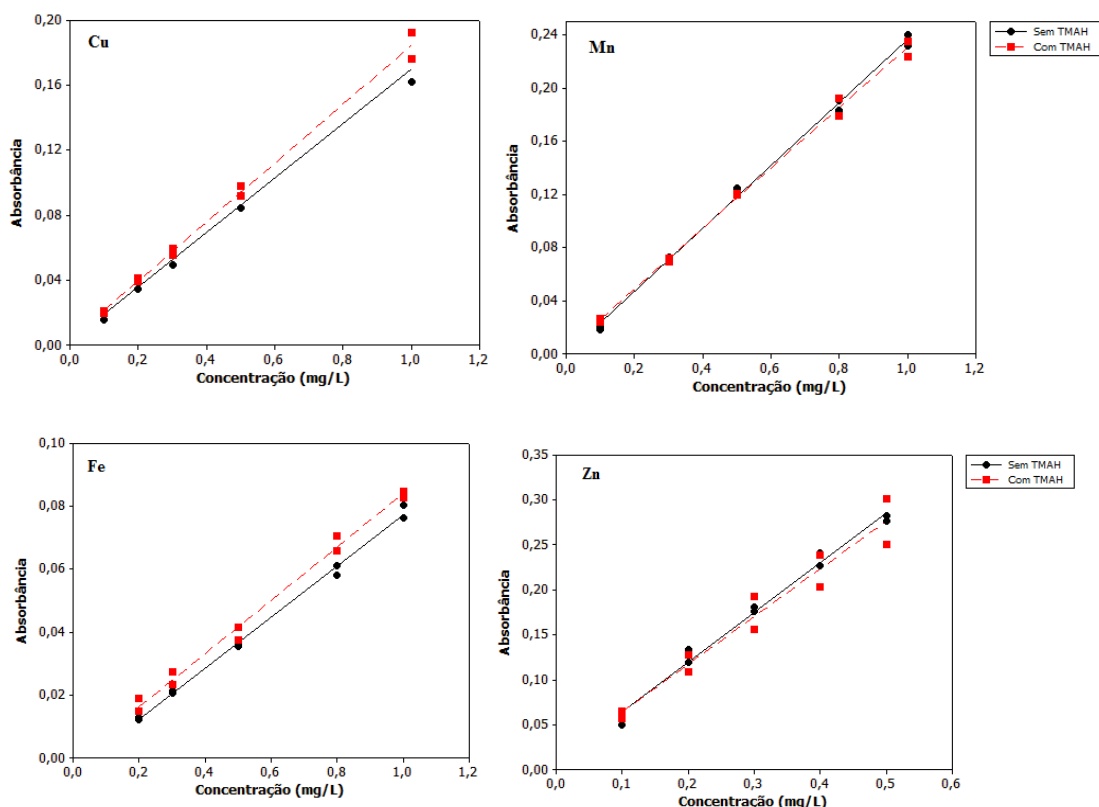


Figura 1. Curvas analíticas obtidas para a determinação de Cu, Mn, Fe e Zn por FAAS empregando calibração por padrão externo (●) e por adição com TMAH (■).

Pode-se verificar na Figura 1 que as curvas analíticas na presença e na ausência de TMAH apresentaram inclinações similares, indicando que não há interferência proveniente da viscosidade do TMAH. A Tabela 5 apresenta cálculos estatísticos (regressão linear) que comprovam a igualdade das curvas.³¹⁻³³

Todas as curvas analíticas apresentaram os valores de $F_{regressão}$ maiores que os valores de $F_{crítico(0,05;1,8)} = 5,32$ e $p < 0,05$, portanto, as regressões lineares foram significativas no nível de confiança de 95%. Nesse mesmo nível de confiança, os modelos não apresentaram falta de ajuste, pois os valores de F_{aj} ficaram menores que os valores de

$F_{crítico(0,05; 3,5)} = 5,41$ e $p > 0,05$, portanto, o modelo linear é aceito. Observando os intervalos de confiança para cada metal, notou-se que as inclinações das curvas analíticas podem ser consideradas similares, pois os intervalos de confiança se sobrepõem. Também foram calculadas as razões dos coeficientes angulares dos dois métodos de calibração nas faixas de trabalho estudadas, e todas ficaram próximas de 1 (1,08, 1,05, 1,04 e 1,04 para Cu, Mn, Fe e Zn, respectivamente). Silva *et al.*²⁸ avaliaram curvas analíticas em solução aquosa em meio ácido com HNO₃ e em meio alcalino com TMAH, e também não encontraram diferenças significativas entre as mesmas.

Tabela 5. Regressão Linear das curvas analíticas, coeficientes angulares e intervalos de confiança na ausência e presença de TMAH para os metais Cu, Fe, Mn e Zn

Resultados da Regressão							
Metal	Calibração	$F_{regressão}$	valor	$F_{faj.}$	valor	Coeficiente Angular	Intervalo Confiança
			r-p		-p		
Cu	MA	1256,21	0,00	0,17	0,92	0,168 ± 0,005	0,157 a 0,178
	TMAH	1616,68	0,00	0,05	0,98	0,181 ± 0,005	0,171 a 0,192
Fe	MA	2160,50	0,00	0,93	0,49	0,081 ± 0,002	0,077 a 0,085
	TMAH	1027,70	0,00	0,56	0,66	0,085 ± 0,003	0,079 a 0,091
Mn	MA	2834,21	0,00	2,61	0,16	0,238 ± 0,004	0,228 a 0,249
	TMAH	2300,31	0,00	0,27	0,84	0,228 ± 0,005	0,217 a 0,239
Zn	MA	745,29	0,00	1,97	0,24	0,555 ± 0,020	0,508 a 0,602
	TMAH	157,19	0,00	0,04	0,99	0,533 ± 0,098	0,435 a 0,631

MA: Meio Aquoso; TMAH: Adição de TMAH; *F_{regressão}*: F de regressão; *F_{faj.}*: F de falta de ajuste

A linearidade das curvas analíticas com padrão externo para cada metal (0,1 a 1,0 mg L⁻¹ para Cu e Mn, 0,2 a 1,0 mg L⁻¹ para Fe e 0,1 a 0,5 mg L⁻¹ para Zn) também foram avaliadas por regressão linear no nível de 95% de confiança. Verificou-se que o modelo linear foi significativo para as faixas de concentração estudadas, pois os valores observados de $F_{regressão}$ foram maiores do que o valor do $F_{crítico (0,05; 1,13)} = 4,67$ e os valores de $p < 0,05$. No mesmo nível de confiança, o modelo linear não apresentou falta de ajuste, pois os valores observados de F_{faj} foram menores do que o valor do $F_{crítico (0,05; 3, 10)} = 3,71$ e os valores de $p > 0,05$. Para o coeficiente de determinação (R^2) que é a

variabilidade dos dados experimentais explicados pelo modelo linear gerado,³² os valores de R^2 para o Cu e Fe foram de 0,994, para o Mn foi de 0,985 e para o Zn 0,986. Considerando o coeficiente de correlação (r), com base no R^2 , obtêm-se valores de r iguais a 0,997, 0,997, 0,992 e 0,993, para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente, valores esses, maiores do que o limite recomendado pela ANVISA³⁴ ($r > 0,99$).

Para verificar a significância dos coeficientes da curva analítica (linear e angular) e avaliar se passam pela origem, foi aplicado um teste-t no nível de 95% de confiança. Os resultados do teste-t estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do teste-t no nível de 95% de confiança para os metais Cu, Fe, Mn e Zn

Metal	$t_{\text{calculado}}$ linear	valor-p	$t_{\text{calculado}}$ angular	valor-p
Cu	0,88	0,392	46,30	0,000
Fe	4,14	0,001	46,46	0,000
Mn	0,01	0,989	29,11	0,000
Zn	1,63	0,127	30,29	0,000

$t_{\text{crítico}}(0,025; 13) = 2,16$; $t_{\text{calculado}}$ linear: teste t aplicado ao coeficiente linear para verificar sua significância; $t_{\text{calculado}}$ angular: teste t aplicado ao coeficiente angular para verificar sua significância

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicaram que para o metal Cu, Mn e Zn os coeficientes linear não foram significativos com $p > 0,05$, indicando que a curva passa pela origem, já que o Fe o coeficiente linear foi significativo com $p < 0,05$. Os coeficientes angulares foram significativos para todos os metais com $p < 0,05$. Assim, a análise do teste-t indicou que a curva analítica de padrão externo para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn podem ser utilizadas, pois apresentaram linearidade na faixa de concentração estudada.

Os valores dos limites de detecção e de quantificação (LD e LQ) dos métodos propostos foram calculados para verificar a sensibilidade de cada método de preparo de amostra proposto e estão representados na

Tabela 7. Os valores de LD e de LQ para Fe e Zn na digestão ácida foram superiores aos determinados pela solubilização alcalina.

Matusiewicz e Golik²⁹ descreveram em seu trabalho que os pequenos volumes de TMAH e sua pureza e o menor manuseio no preparo, proporcionaram “brancos” baixos, diminuindo assim os valores do limite de detecção dos analitos nas amostras. Outras vantagens da solubilização alcalina foram os fatos da mesma utilizar menor tempo e menor temperatura durante o processo, minimizando o risco de contaminação das amostras. O LD determinado para o Fe neste trabalho foi menor que o descrito por Nunes *et al.*²⁵, para a digestão ácida ($18,0 \mu\text{g g}^{-1}$) e para a solubilização com TMAH ($16,0 \mu\text{g g}^{-1}$) em carnes frescas e processadas.

Tabela 7. Valores de LD e LQ (mg kg^{-1}) dos métodos propostos para determinações dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em testículo bovino por F AAS

Metal	Digestão ácida		Solubilização alcalina	
	LD	LQ	LD	LQ
Cu	0,10	0,34	0,12	0,41
Fe	1,02	3,40	0,74	2,50
Mn	0,16	0,53	0,16	0,54
Zn	0,67	2,20	0,23	0,77

A Tabela 8 apresenta os resultados de repetitividade e de precisão intermediária dos métodos propostos, indicando valores de desvio padrão relativo (RSD) inferiores ao

valor máximo recomendado pela AOAC²² que é de 7,3% para repetitividade e de 15,0% para precisão intermediária. O método de solubilização alcalina, na maioria dos casos,

proporcionou os menores valores de RSD (%) para os metais avaliados em relação ao procedimento de digestão ácida.

Tabela 8. Valores da média, intervalos de confiança e RSD (%) para a repetitividade, precisão intermediária e valor de Horrat do método de digestão ácida e solubilização alcalina

Metais	Digestão ácida					Solubilização alcalina				
	Repetitividade		Precisão intermediária			Repetitividade		Precisão intermediária		
	Média mg kg ⁻¹	RSD %	Média mg kg ⁻¹	RSD %	Horrat	Média mg kg ⁻¹	RS D %	Média mg kg ⁻¹	RSD %	Horrat
Fe	11,6 ± 0,7	6,5	10,4 ± 0,6	6,3	1,0	10,2 ± 0,4	4,3	10,0 ± 0,5	5,6	0,5
Zn	15,3 ± 0,4	2,8	12,5 ± 0,9	7,0	1,2	13,9 ± 0,6	4,5	12,6 ± 0,5	4,4	0,6
Cu	16,7 ± 0,9	5,7	17,4 ± 1,1	6,7	0,7	16,4 ± 0,7	4,2	16,8 ± 0,5	3,3	0,6
Mn	15,5 ± 0,5	3,2	16,1 ± 0,8	5,5	1,0	14,9 ± 0,5	3,1	16,1 ± 0,9	5,9	1,0

Os valores de Horrat foram calculados pela equação $Horrat = RSD_{pi}/RSD_{Horwitz}$, onde RSD_{pi} é o desvio padrão relativo para precisão intermediária e $RSD_{Horwitz}$ é o desvio padrão relativo predito. O $RSD_{Horwitz}$ é calculado pela equação $RSD_{Horwitz} = 2 * C^{-0,15}$, onde C é a concentração do analito.³⁵ Os valores de Horrat para os métodos de solubilização alcalina e digestão ácida dos tecidos foram adequados, pois o Horrat verifica se os métodos apresentam precisão aceitável nas determinações dos metais de interesse Cu, Fe, Mn e Zn.³⁵ Para que o limite seja aceitável não deve ser maior do que 1,3 segundo González *et al.*³⁵ e de 2,0 segundo Valdersnes *et al.*³⁶. A análise do teste-F

indicou-se que não existem diferenças significativas entre a precisão do método por solubilização alcalina em relação ao método por digestão ácida, pois os valores de $F_{calculado}$ foram inferiores ao valor de $F_{critico (0,05,8,8)} = 3,44$, com $p > 0,05$. Portanto, os dois métodos apresentam precisão adequada para a determinação dos metais de interesse nos tecidos biológicos.

A exatidão dos métodos foi realizada por meio de testes de recuperação por adição de padrão em dois níveis de concentração para cada metal avaliado. Os valores das recuperações estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração média e taxa de recuperação para Cu, Fe, Mn e Zn em amostra de testículo bovino

Metal	Digestão ácida			Solubilização Alcalina	
	Concentração Adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração Determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração Determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Cu	0,50	0,53 ± 0,06	105,50 ± 0,06	0,500 ± 0,005	100,80 ± 0,01
	1,00	1,01 ± 0,01	100,70 ± 0,01	0,930 ± 0,004	92,80 ± 0,01
Fe	0,50	0,52 ± 0,04	103,30 ± 0,04	0,49 ± 0,04	98,70 ± 0,04
	1,00	0,96 ± 0,08	96,20 ± 0,09	1,05 ± 0,20	104,8 ± 0,1
Mn	0,50	0,470 ± 0,008	94,90 ± 0,01	0,52 ± 0,02	103,70 ± 0,02
	1,00	0,950 ± 0,004	95,40 ± 0,01	1,02 ± 0,07	101,90 ± 0,07
Zn	0,25	0,23 ± 0,06	92,00 ± 0,06	0,24 ± 0,03	96,00 ± 0,04
	0,50	0,45 ± 0,02	89,60 ± 0,02	0,48 ± 0,04	95,70 ± 0,03

Recuperação recomendada pela AOAC (2012): 80 – 110%

A porcentagem de recuperação, no nível de 0,25 mg L⁻¹, para Zn foi melhor na solubilização alcalina (96,00% ± 0,04) do que na digestão ácida (92,00% ± 0,06). No nível de 0,5 mg L⁻¹ de dopagem, a recuperação foi sempre mais próxima de 100% nos processos de solubilização alcalina (95,70 ± 0,03 a 103,70% ± 0,02) em relação a digestão ácida (89,60 ± 0,02 a 105,50% ± 0,06). E no nível de 1,0 mg L⁻¹, a solubilização alcalina proporcionou recuperações entre 92,80 (± 0,01) a 104,8% (± 0,1) e a digestão ácida entre 95,40 (± 0,01) a 100,70% (± 0,01).

A exatidão também foi avaliada por meio de comparação entre os métodos (digestão ácida e solubilização alcalina) aplicando o teste-*t*, indicando que não existem diferenças significativas entre as médias amostrais de Cu, Fe, Mn e Zn pelos métodos avaliados, pois os valores de $t_{calculado}$ foram inferiores ao valor de $t_{critico} (0,05,16) = 2,120$, com $p > 0,05$. Os cálculos dos intervalos de confiança incluíram o zero e confirmaram que não existem diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostras avaliados.³¹⁻³³ Desta forma, pode-se afirmar que os dois métodos de preparo de

amostra apresentam exatidão adequada para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal por FAAS e que não foram afetados de forma significativa por erros sistemáticos.

Tanto o método de digestão ácida quanto o de solubilização alcalina pode ser utilizado para a determinação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal por FAAS. Embora os dois procedimentos sejam eficientes, pode ser observado que na solubilização alcalina, a maioria dos resultados obtidos durante a validação sempre indicaram menores valores de LD e LQ, menores valores de RSD (%) na precisão e maiores recuperações na exatidão. Portanto, um menor tempo de preparo e menor volume de reagente são necessários, além da observação que com o uso de TMAH foi eliminado completamente a gordura do tecido animal, evitando alteração da viscosidade do digerido durante a aspiração da amostra pelo amostrador do FAAS.

4. Conclusão

As duas metodologias analíticas propostas

(digestão ácida e solubilização alcalina) para o preparo de amostras de testículo bovino foram eficientes para a determinação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS. Os parâmetros avaliados no estudo de validação (linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão) encontram-se dentro dos critérios recomendados pela AOAC. A viscosidade do TMAH não interferiu nas quantificações dos metais por FAAS, pois qualquer um dos métodos de calibração (métodos de padrão externo em meio aquoso e com adição de TMAH) podem ser utilizados nas determinações. Embora os dois métodos tenham apresentado adequado exatidão e precisão, o método da solubilização alcalina, requereu menor tempo de preparo, menor volume de reagente e eliminação das gorduras provenientes da matriz.

Agradecimentos

Capes, CNPq e Fundação Araucária.

Referências Bibliográficas

¹ Nunes, A. M.; Sousa, R. A.; Silva, C. S.; Peixoto, R. R. A.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Cadore, S. Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. *Journal of Food Composition and Analysis* **2013**, *32*, 1. [CrossRef]

² Mulware, S. J. Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. *Journal of Biophysics* **2013**, *8*. [CrossRef] [PubMed]

³ Fouani, L.; Menezes, S. V.; Paulson, M.; Richardson, D. R.; Kovacevic, Z. Metals and metastasis: Exploiting the role of metals in cancer metastasis to develop novel anti-metastatic agents. *Pharmacological Research* **2017**, *115*, 275. [CrossRef] [PubMed]

⁴ Midio, A. F.; Martins, D. I. *Toxicologia de alimento*, São Paulo, 2000.

⁵ Skrajnowska, D.; Bobrowska, B.; Tokarz, A.; Kuras, M.; Rybicki, P.; Wachowicz, M. The effect of zinc and copper sulphate supplementation on tumor and hair concentrations of trace elements (Zn, Cu, Fe, Ca, Mg, P) in rats with DMBA induced breast cancer. *Polish Journal of Environmental Studies* **2011**, *20*, 1585. [Link]

⁶ Andrade, C. B.; Barros, A. M.; Magalhães, A. C. P.; Castro, L. L. C.; Takasei, I.; Comparação dos teores de Cu e Zn em leguminosas cruas e após serem processadas termicamente em meio salino e aquoso. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2004**, *24*, 316. [CrossRef]

⁷ Nogueira, A. R. A.; *Resumo do VIII Encontro Nacional sobre métodos dos laboratórios da embrapa*, Jaguariúna, Brasil, 2003. [Link]

⁸ Hoenig, M.; Kersabiec, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **1996**, *51*, 1297. [CrossRef]

⁹ Sousa, R. A. de; Sabarense, C. M.; Prado, G. L. P.; Metze, K.; Cadore, S. Lead biomonitoring in different organs of lead intoxicated rats employing GF AAS and different sample preparations. *Talanta* **2013**, *104*, 90. [CrossRef] [PubMed]

¹⁰ IAL. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Instituto Adolfo Lutz, 2a. ed., São Paulo, 2008. [Link]

¹¹ Moreau, R. L. M.; Siqueira, M. E. P. B. *Toxicologia analítica*, Rio de Janeiro, 2008.

¹² Nobrega, J. A.; Santos, M. C.; Sousa, R. A. de; Cadore, S.; Barnes, R. M.; Tatro, M. Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B* **2006**, *61*, 465. [CrossRef]

¹³ Gromboni, C. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, 2012. [Link]

¹⁴ Aranha, T. S. C. P.; Oliveira, A.; Queiroz, H. M.; Cadore, S. A fast alkaline treatment for cadmium determination in meat samples. *Food Control* **2016**, *59*, 447. [CrossRef]

¹⁵ Bendicho, C.; Calle, I. D. L.; Pena, F.; Costas, M.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *31*, 50. [CrossRef]

- ¹⁶ Martins, P.; Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Kemiciki, G. A. Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *470*, 195. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Ghisi, M.; Chaves, E. S.; Quadros, D. P. C.; Marques, E. P.; Curtius, A. J.; Marques, A. L. B. Simple method for the determination of Cu and Fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide. *Microchemical Journal* **2011**, *98*, 62. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Silva, A. F.; Borges, D. L. G.; Welz, B.; Heitmann, U.; Curtius, A. J. Determination of cobalt in biological samples by linesource and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment. *Spectrochimica Acta Part B* **2005**, *60*, 693. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ U.S. EPA - Method 1669 – Sampling ambient water for determination of trace metals at EPA water quality criteria level. DC: Office of Science and Technology Eng. and Analysis Division. Washington, 1996. [[Link](#)]
- ²⁰ Carvalho, M. P. P.; Koivisto, M. B. de; Perri, S. H. V.; Sampaio, T. S. M. C. Estudo retrospectivo da esterilização em cães e gatos no município de Araçatuba, SP. *Revista Ciência em Extensão* **2007**, *3*, 81. [[Link](#)]
- ²¹ ICH – International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96), 1996. [[Link](#)]
- ²² AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 20th Edition. 2016. APÊNDICE F. [[Link](#)]
- ²³ NATA (National Association of Testing Authorities) – Guidelines for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods. Australia, 2012. [[Link](#)]
- ²⁴ Kelte Filho, I.; Butik, M.; Jaski, A. C.; Quináia, S. P. Fast method to determine the elements in maize flour: reduction in preparation time and reagent consumption. *Brazilian Journal of Food Technology* **2018**, *21*, 1. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Nunes, A. M.; Acunha, T. S.; Oreste, E. Q.; Lepri, F. G.; Vieira, M. A.; Curtius, A. J.; Ribeiro, A. S. Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2011**, *22*, 1850. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Cerulli, N.; Campanella, L.; Grossi, R.; Politi, L.; Scandurra, R.; Soda, G.; Gallo, F.; Damiani, S.; Alimonti, A.; Petrucci, F.; Caroli, S. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in neoplastic kidneys and in renal tissue of fetuses, newborns and corpses. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2006**, *20*, 171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Tizioto, P. C.; Gromboni, C. F.; Nogueira, A. R. A.; Souza, M. M.; Mudadu, M. A.; Tholon, P.; Rosa, A. N.; Tullio, R. R.; Medeiros, S. R.; Nassu, R. T.; Regitano, L. C. A. Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nelore cattle. *Meat Science* **2014**, *96*, 436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ da Silva, J. B. B.; Borges, D. L. G.; Veiga, M. A. M. S. da; Curtius, A. J.; Welz, B. Determination of cadmium in biological samples solubilized with tetramethylammonium hydroxide by electrothermal atomic absorption spectrometry, using ruthenium as permanent modifier. *Talanta* **2003**, *60*, 977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Matusiewicz, H.; Golik, B. Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization. *Microchemical Journal* **2004**, *76*, 23. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Batista, B. L.; Grotto, D.; Rodrigues, J. L.; Souza, V. C. O.; Junior, F. B. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *646*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ³¹ Barros Neto, B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na indústria*. 3a. ed., Campinas, São Paulo, 2007.
- ³² Freire, C. A. L.; Charnet, E. M. R.; Bonvino, H.; Charnet, R.; *Análise de modelos de regressão linear*, Campinas, São Paulo, 1999.
- ³³ Miller, J. N.; Miller, J. C.; *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4a. ed., Madrid, 2002.
- ³⁴ ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf/10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42>. Acesso em: 1 junho 2016.
- ³⁵ González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. *Talanta* **2010**, *82*, 1995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Valdersnes, S.; Fecher, P.; Maage, A.; Julshamn, K. Collaborative study on determination of mono methylmercury in seafood. *Food Chemistry* **2016**, *194*, 424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]