

## Artigo

## Extração Assistida por Ultrassom Aplicada a Determinação de Mg, Mn e Zn em Sementes e Farinhas de Chia por F AAS

Mendivelso, E. J. D.; Andrade, J. K.; Felsner, M. L.\*

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (4), 1377-1404. Data de publicação na Web: 2 de setembro de 2019

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

### Ultrasound-Assisted Extraction Applied to Mg, Mn and Zn Determination in Chia Seeds and Flours by F AAS

**Abstract:** In recent years, consumption of chia seeds and flours has grown because of the numerous health benefits attributed to it. Although, the chia is recognized as an important source of minerals for nutrition, analytical methods for sample preparation and determination of the metals in this food are still scarce. Thus, in an unprecedented way, an ultrasound-assisted extraction method (UAE) was optimized by a factorial design for the determination of Mg, Zn and Mn in chia seeds and flours using a dilute solution of nitric acid (5.0 %, v/v), a time of 30 minutes of sonication, a sample mass of 0.5 g and a sonication frequency of 42 kHz. For the determination of Ca and Fe further optimization studies are still required for the complete extraction of these metal from the matrix. In addition, the UAE methodology presented good accuracy when compared with the wet digestion (values of  $t_{calculated} < t_{critical}$  and  $p-values > 0.05$ ), excellent precision (RSD values between 1 and 3.8 %) and linearity ( $R^2 \geq 98$  %) as well as low detection and quantification limits (LOD between 0.8 and 2  $\mu\text{g g}^{-1}$  and LOQ between 3 and 6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). The application of the UAE methodology in routine analyzes in food quality control laboratories is interesting because it presents characteristics such as being environmentally friendly when compared to other methods of sample preparation due to the low consumption of reagents and energy, for offering greater safety to the analyst and for using low-cost instrumentation.

**Keywords:** Chia; metals; ultrasound-assisted extraction; factorial design; method validation; F AAS.

### Resumo

Nos últimos anos, o consumo de sementes e farinhas de chia tem crescido devido aos numerosos benefícios à saúde atribuídos a ela. Embora a chia seja reconhecida como uma fonte de minerais importante para a nutrição são ainda escassos métodos analíticos para a preparação de amostra e de determinação de metais neste alimento. Então, de forma inédita, um método de extração assistida por ultrassom (EAU) foi otimizado por um planejamento fatorial para a determinação de Mg, Zn e Mn em sementes e farinhas de chia usando como solvente de extração uma solução diluída de ácido nítrico (5,0 %, v/v), um tempo de 30 minutos de sonicação, uma massa de amostra de 0,5 g e uma frequência de sonicação de 42 kHz. Para a determinação de Ca e Fe mais estudos de otimização são ainda necessários para a completa extração destes metais da matriz. Além disso, a metodologia de EAU apresentou boa exatidão quando comparada com a digestão por via úmida (valores de  $t_{calculada} < t_{critico}$  e valores de  $p > 0,05$ ), excelente precisão (valores de RSD entre 1 e 3,8 %) e linearidade ( $R^2 \geq 98$  %) bem como baixos limites de detecção e de quantificação (LD entre 0,8-2 e LQ entre 3 e 6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). A aplicação da metodologia de EAU em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade de alimentos é interessante porque apresenta características tais como ser ambientalmente amigável quando comparada a outros métodos de preparo de amostras devido ao baixo consumo de reagentes e energia, por oferecer maior segurança ao analista e por usar instrumentação de baixo custo.

**Palavras-chave:** Chia; metais; extração assistida por ultrassom; planejamento fatorial; validação de métodos; F AAS.

\* Universidade Estadual do Centro Oeste, Departamento de Química, Campus CEDETEG, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

 [felsner@unicentro.br](mailto:felsner@unicentro.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20190095](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190095)

## Extração Assistida por Ultrassom Aplicada a Determinação de Mg, Mn e Zn em Sementes e Farinhas de Chia por F AAS

Ericka Johanna Diaz Mendivelso, Jucimara Kulek de Andrade, Maria Lurdes Felsner\*

Universidade Estadual do Centro Oeste, Departamento de Química, Campus CEDETEG, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

\* [felsner@unicentro.br](mailto:felsner@unicentro.br)

*Recebido em 18 de junho de 2019. Aceito para publicação em 29 de julho de 2019*

### 1. Introdução

### 2. Materiais e Métodos

#### 2.1. Amostragem

#### 2.2. Reagentes, equipamentos e parâmetros instrumentais

#### 2.3. Preparo da amostra

#### 2.4. Estudo de otimização

#### 2.5. Estudo de validação

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Otimização da extração assistida por ultrassom

#### 3.2. Estudo de validação

### 4. Conclusão

## 1. Introdução

Recentemente, há uma tendência mundial na busca de alimentos mais saudáveis. Dessa forma, alimentos da antiguidade têm sido redescobertos ou alimentos de outras culturas têm sido experimentados, como um dos caminhos para encontrar novos sabores, texturas e nutrientes. Dessa maneira, a ciência moderna concluiu que as dietas pré-colombianas eram superiores em seu valor nutricional e nutracêutico e esses alimentos são conhecidos atualmente como alimentos funcionais.<sup>1</sup>

Os alimentos funcionais têm se destacado em todo o mundo nos últimos anos por causa da preocupação dos consumidores em adotar um estilo de vida saudável. Um motivo de preocupação é o crescente número de pessoas que sofrem de doenças cardiovasculares (DCV), pressão arterial alta, obesidade, diabetes e outras doenças relacionadas.<sup>2</sup> Portanto, verifica-se uma crescente tendência do mercado para o consumo de alimentos funcionais, como alimentos enriquecidos com fibras, óleos essenciais, vitaminas, minerais, antioxidantes, flavonoides e antocianinas, que podem contribuir para a prevenção de doenças

cardiovasculares, respiratórias e cancerígenas, entre outras.<sup>3</sup>

O aumento do consumo de alimentos mais saudáveis e com propriedades funcionais no Brasil é uma prerrogativa para que efetivamente seja possível consolidar uma alimentação saudável e segura em várias regiões do país. O consumo da semente de chia tem despertado um interesse crescente devido aos inúmeros benefícios para a saúde que lhe são atribuídos, nomeadamente na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e na prevenção do ganho de peso.<sup>4</sup>

As sementes de chia apresentam constituintes importantes do ponto de vista nutricional como proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras dietéticas, minerais, vitaminas e matéria seca.<sup>5</sup> Além disso, estas sementes possuem uma quantidade elevada de compostos antioxidantes,<sup>6</sup> são excelentes fontes de ácidos graxos e também se destacam em termos de minerais. Elas apresentam teores elevados de elementos como cálcio, fósforo, magnésio e potássio, baixo teor de sódio e bons níveis de micronutrientes como ferro, zinco, manganês e cobre.<sup>7</sup> É importante ressaltar que a diferença marcante entre a chia e outras fontes de ômega-3, é seu baixo teor de sódio e por esta não conter glúten.<sup>8-9</sup> Portanto, para as pessoas que sofrem de pressão arterial elevada ou são celíacas e precisam de uma dieta restrita em sódio e glúten, o consumo da chia e dos seus derivados poderia ser vantajoso.<sup>8</sup>

Apesar da chia ser reconhecida como uma fonte de minerais, importantes do ponto de vista nutricional são escassos ainda na literatura métodos analíticos para o preparo da amostra e para a determinação de metais. Recentemente, têm sido reportados alguns estudos dedicados à avaliação do perfil elementar da chia descrevendo métodos analíticos que fazem uso de técnicas espectrométricas a base de plasma, como a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) ou a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP - MS), adotando como método de preparo de amostra a

digestão assistida por micro-ondas.<sup>8,10-12</sup> Todavia, estes métodos de determinação, apesar de serem multielementares necessitam de instrumentação e reagentes de alto custo e oferecem menor segurança ao analista, além de exigirem um preparo de amostra mais rigoroso do que outras técnicas de espectrometria atômica.<sup>13</sup>

A maioria dos métodos de preparo de amostras para a análise elementar envolve a destruição da matriz orgânica, fazendo o uso de ácidos com propriedades oxidantes e de peróxido de hidrogênio a temperaturas elevadas em sistemas abertos ou fechados para posterior análise por técnicas de espectrometria atômica.<sup>14</sup> No entanto, muitos desses processos requerem equipamentos de laboratório complexos, e aumentam o risco de contaminação e perdas do analito por volatilização ou pela adsorção nos frascos de digestão.<sup>15-16</sup> Em vista disso, torna-se muito importante o desenvolvimento de novos métodos analíticos utilizando técnicas de espectrometria atômica e de preparação de amostra mais rápidas, de baixo custo e ambientalmente amigáveis para os processos de controle de qualidade que visem monitorar a composição elementar de alimentos como a chia.<sup>15</sup>

Devido a estes inconvenientes novos métodos de preparo de amostra para a análise elementar têm sido estudados como a extração assistida por ultrassom, a oxidação alcalina e os processos oxidativos avançados. Dentre estes, destaca-se a extração assistida por ultrassom que se baseia na lixiviação de metais a partir de materiais em pó em suspensões contendo soluções ácidas diluídas.<sup>16-19</sup> Neste processo as ondas ultrassônicas promovem a extração do analito da matriz atuando na matéria orgânica presente na amostra e provocando a liberação para o meio extrator do metal de interesse.<sup>20-21</sup> Todavia, a eficácia da extração assistida por ultrassom é influenciada por diferentes fatores instrumentais e por características da amostra tais como frequência de sonicação, tamanho de partículas, amplitude, temperatura de sonicação, tempo de sonicação, natureza e composição do solvente

extrator, entre outras.<sup>19-21</sup> Portanto, para otimizar um método de extração assistida por ultrassom torna-se necessário o uso de ferramentas multivariadas como as técnicas de planejamento de experimentos. Estas apresentam inúmeras vantagens em relação às estratégias univariadas, como exigir um menor número de experimentos no processo de otimização que resultará em menores custos durante o desenvolvimento do método analítico, proporcionar um melhor entendimento do sistema em estudo, bem como possibilitar a identificação de efeitos de interação entre as variáveis sob investigação.<sup>22,23</sup>

Apesar disso, poucos pesquisadores têm se dedicado a estudar o perfil elementar de sementes e de farinhas de chia<sup>7,10-12</sup> e até o momento, não foi reportado nenhum trabalho aplicando a extração assistida por ultrassom como método de preparo de amostra para esta matriz. Outro aspecto a ser ressaltado é que os trabalhos encontrados na literatura não apresentam um estudo de validação intralaboratorial. A validação das metodologias desenvolvidas apresenta inúmeras vantagens tais como conferir maior confiabilidade aos resultados obtidos, maior facilidade na transferência da metodologia analítica para análises de rotina em laboratórios diferentes daquele em que ela foi criada bem como menores custos na tomada de decisões em ambientes industriais ou de fiscalização de alimentos.<sup>13, 24-26</sup>

Desta forma, com o intuito de minimizar os inconvenientes apresentados pelos métodos tradicionais de preparo de amostra, neste trabalho foi desenvolvido e validado um método de extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia utilizando-se a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) e diferentes ferramentas quimiométricas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Amostragem

As amostras de chia foram identificadas com letras e números sendo FC a codificação adotada para as farinhas de chia e SC para as sementes de chia. Para o estudo de otimização foi utilizada a amostra de farinha de chia identificada como FC4. Para o estudo de validação e de aplicação da metodologia analítica foram utilizadas oito amostras de sementes de chia (SC1, SC4 e SC5 provenientes de São Paulo, SC6 e SC7 do Rio Grande do Sul e SC3 do Mato Grosso do Sul) e cinco amostras de farinhas de chia (FC3, FC4 e FC5 provenientes do Paraná, FC1 de Santa Catarina e FC2 de São Paulo) comercializadas por diferentes fabricantes e adquiridas em supermercados e outros estabelecimentos comerciais no período entre 2015 e 2016. Para a determinação dos metais por F AAS em torno de 100 g das amostras de sementes ou de farinha foram moídas em um moedor de café e grãos e posteriormente peneiradas em peneira de abertura de 40 Mesh até atingir tamanho de partícula < 425  $\mu\text{m}$ . Em seguida, estas foram armazenadas em frascos fechados de polipropileno e mantidas em ambiente seco e arejado até a realização das análises.

### 2.2. Reagentes, equipamentos e parâmetros instrumentais

Em todas as análises foi empregada água deionizada obtida em um sistema de purificação de osmose reversa OS 10LX TQ50 (GEHAKA). Todas as soluções foram preparadas empregando-se reagentes de grau analítico (ácido nítrico 65 % (v/v) (FMAia) e peróxido de hidrogênio 35 % (m/v) (Biotec)). As soluções analíticas dos metais Ca, Fe, Mn, Zn e Mg foram preparadas diariamente a partir de diluições de soluções padrão de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (SpecSol). Além disso, equipamentos e

utensílios laboratoriais como banho ultrassônico Spencer modelo CD 4800, peneira de aço inoxidável Bertel, moedor de grãos e café Cuisinard modelo DCG-20BKN e balança analítica Shimadzu modelo AUW220D também foram utilizados no estudo.

Para a determinação de Ca, Fe, Mn, Zn e Mg foi utilizado um espectrômetro de

absorção atômica com chama – F AAS (Varian, modelo AA 220). Para a atomização foi utilizada uma chama composta de ar/acetileno para Fe, Mn, Zn e Mg e uma chama composta de acetileno/óxido nitroso para Ca. Outras condições instrumentais foram definidas de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros operacionais empregados na determinação de Fe, Ca, Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia por F AAS

Parâmetros	Mn	Zn	Mg	Fe	Ca*
Comprimento de onda (nm)	279,5	213,9	285,2	248,5	422,7
Corrente de lâmpada (mA)	5	5	4	5	10
Largura da fenda (nm)	0,2	1,0	0,5	0,2	0,1
Fluxo de acetileno ou óxido nitroso (L min <sup>-1</sup> )	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Fluxo de ar (L min <sup>-1</sup> )	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

\*Na análise de Ca o gás acetileno foi substituído pelo gás óxido nitroso

Previamente ao uso, todo o material empregado foi lavado com água e detergente, e posteriormente enxaguado com água destilada e colocado em banho de HNO<sub>3</sub> (3 %, v/v) por no mínimo 24 h. Após a retirada do banho ácido, o material foi lavado com água destilada e deixado em bandejas plásticas previamente descontaminadas.

### 2.3. Preparo da amostra

#### 2.3.1. Extração assistida por ultrassom

Uma massa de 0,5 g das sementes ou das farinhas de chia, previamente moída e peneirada como descrito no item 2.1, foi pesada em um béquer de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 25 mL de HNO<sub>3</sub> 5 % (v/v) e o béquer foi coberto com vidro relógio e colocado na região central de um banho ultrassônico operando com potência de 70 W

e frequência de 42 kHz e a mistura resultante foi submetida à sonicação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a extração assistida por ultrassom, a mistura resultante foi filtrada em papel de filtro qualitativo e o filtrado foi analisado por F AAS. As extrações foram realizadas em duplicatas. Brancos analíticos sem a adição da amostra de chia foram realizados também em duplicata.

#### 2.3.2. Digestão por via úmida

Como método de preparo de amostra de referência foi utilizada a digestão por via úmida descrita por Brandão *et al.* (2010),<sup>14</sup> com modificações. Inicialmente, uma massa de 0,5 g de sementes ou de farinhas de chia, previamente moída e peneirada conforme descrito no item 2.1, foi pesada em béquer de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado (65 %, v/v) e o béquer foi coberto com vidro de relógio.

Posteriormente, a mistura foi aquecida em banho de areia a 100 °C por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 % (m/v) e mistura foi aquecida a 90 °C por mais 4 horas até próximo da secura. O resíduo resultante da digestão após resfriamento foi diluído para 25 mL com água destilada e analisado por F AAS. As digestões das amostras foram realizadas em duplicata. Brancos analíticos, sem a adição da amostra de chia, foram também realizados em duplicata.

#### 2.4. Estudo de otimização

Um planejamento fatorial em dois níveis aplicado na amostra de farinha de chia (FC4), que não foi submetida a nenhum processo de moagem e peneiramento, foi empregado com o objetivo de avaliar a influência das variáveis concentração da solução extratora (% HNO<sub>3</sub>, v/v) e tempo de sonicação (minutos) na extração assistida por ultrassom de Ca, Fe, Mn, Zn e Mg de farinhas e de sementes de chia. Todos os ensaios do planejamento bem como os brancos analíticos foram realizados em quadruplicata. Na Tabela 2, são apresentadas as variáveis estudadas e os respectivos níveis avaliados para a otimização do preparo de amostra utilizando a extração assistida por ultrassom.

**Tabela 2.** Fatores e níveis no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para a determinação de Ca, Fe, Mn, Zn e Mg em sementes e farinhas de chia por F AAS

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
Concentração de HNO <sub>3</sub> (% v/v)	5	20
Tempo de sonicação (min.)	10	30

Os efeitos do planejamento fatorial foram calculados pela Equação 1, em que  $\bar{R}^+$  e  $\bar{R}^-$

são as diferenças das médias dos níveis (+) e (-), respectivamente, dos fatores envolvidos.

$$E_f = (R^+) - (R^-)$$

Equação 1

Os efeitos das variáveis nos teores de metais em sementes e em farinhas de chia foram testados para a significância estatística no nível de 95 % de confiança pelo cálculo do erro padrão e pelo gráfico de Pareto. A análise estatística dos dados foi realizada empregando-se o software estatístico *Minitab* for Windows v.16.2.2.<sup>29</sup>

realizada pela análise dos parâmetros: faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão seguindo as recomendações de guias da Anvisa (2017),<sup>30</sup> Inmetro (2018),<sup>31</sup> AOAC (2012)<sup>32</sup> e NATA (2018)<sup>33</sup> e de artigos da literatura.<sup>26-28</sup> Todas as análises estatísticas foram realizadas no nível de 95 % de confiança utilizando o software estatístico *Minitab* for Windows 16.2.2.<sup>29</sup>

#### 2.5. Estudo de validação

A validação do método de preparo de amostra usando a extração assistida por ultrassom para a determinação de metais em sementes e em farinhas de chia por F AAS foi

##### 2.5.1. Curvas analíticas e linearidade

As curvas analíticas de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn foram construídas por três métodos de

padronização. Uma curva analítica de padronização externa com dissolução dos padrões em solução aquosa, uma curva analítica de simulação de meio extrator com dissolução dos padrões em solução de ácido nítrico 5 % (v/v) e uma curva analítica de simulação de meio extrator com dissolução dos padrões em solução de ácido nítrico 20 % (v/v). As curvas de calibração foram construídas dentro da faixa linear de cada elemento (0,3 a 1,5 mg L<sup>-1</sup> para Mn; 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> para Mg; 0,1 a 0,8 mg L<sup>-1</sup> para Zn; 0,1 a 2,0 mg L<sup>-1</sup> para Ca e 0,4 a 2,0 mg L<sup>-1</sup> para Fe), sendo cada ponto analisado em duplicata. Intervalos de confiança para a inclinação das três curvas analíticas de cada método de padronização para os metais Ca, Fe, Mg, Mn e Zn foram construídos para verificar se havia influência do meio extrator na concentração dos metais extraídos. A linearidade das curvas

analíticas de padrão externo aplicadas na determinação de Mg, Mn e Zn foi verificada pela aplicação da técnica de regressão linear e de um teste de falta de ajuste no nível de 95 % de confiança.<sup>26</sup>

### 2.5.2. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados utilizando-se os dados da equação da curva analítica de padrão externo de cada metal. A determinação dos respectivos limites foi realizada a partir do desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico ( $S_B$ ) e da inclinação ( $b$ ) da curva analítica<sup>30-31</sup> de acordo com a Equação 2:

$$LD = \frac{3,3S_B}{b} \text{ e } LQ = \frac{10S_B}{b} \quad \text{Equação 2}$$

### 2.5.3. Precisão

A precisão foi avaliada através da comparação das variâncias ponderadas ( $Sp^2$ ) de cada um dos métodos de preparo de amostra (extração assistida por ultrassom e digestão por via úmida) pela aplicação de um teste  $F$  apropriado e pelo cálculo de intervalos de confiança para a razão entre as variâncias.<sup>31,34</sup> A precisão também foi expressa em termos de repetitividade, pela preparação no mesmo dia de cinco réplicas verdadeiras de uma amostra de farinha de chia (FC2) usando o procedimento descrito no item 2.3.1 e os resultados foram utilizados no cálculo dos desvios padrão relativos (RSD (%)).

### 2.5.4. Exatidão

A exatidão do método proposto (extração assistida por ultrassom) foi avaliada pela comparação com um método de preparo de amostra de referência (digestão por via úmida), aplicando-se um teste- $t$  pareado nas

diferentes amostras de sementes e de farinhas de chia e por uma análise de regressão linear, ambos no nível de 95 % de confiança.<sup>35</sup>

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Otimização da extração assistida por ultrassom

Visando otimizar a extração assistida por ultrassom de Ca, Fe, Mn, Zn e Mg de amostras de chia foi aplicado um planejamento fatorial ( $2^2$ ) (Tabelas 3 e 4) para avaliar a influência da concentração de ácido nítrico (% v/v) e do tempo de sonicação (minutos) na concentração extraída destes metais para a amostra de farinha de chia FC4, a qual não passou previamente por moagem e peneiramento. As variáveis, temperatura (25 °C) e posição dos frascos de extração no banho ultrassônico (centro, a zero cm do fundo), permaneceram constantes. Essas

variáveis foram mantidas constantes, pois são condições recomendadas na literatura como ótimas e podem interferir nos resultados se não forem controladas.<sup>32-33</sup> O banho ultrassônico foi mantido na temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e a posição do frasco contendo a amostra e a solução extratora dentro do banho foi no centro a zero cm do fundo. Os resultados do planejamento fatorial e os efeitos calculados são apresentados na Tabela 3. Os efeitos médios calculados do planejamento fatorial  $2^2$  são apresentados na Tabela 4.

A partir da análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95 % de confiança

(Figuras 1 e 2, Tabela 4) foi considerada como variável significativa para a extração de Ca, Mn e Zn a concentração da solução diluída de ácido nítrico (% v/v) com valores de  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$  e valores de  $p < 0,05$ .

Além disso, não foi observado um efeito de interação significativo entre as duas variáveis estudadas na extração de nenhum dos metais avaliados (Tabela 4). Estes resultados indicam que a concentração da solução diluída de ácido nítrico pode ser otimizada de forma univariada, pois seu efeito não depende dos níveis do tempo de sonicação e vice-versa.

**Tabela 3.** Teores de Ca, Fe, Mn, Zn e Mg em chia e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial  $2^2$

Concentração de HNO <sub>3</sub> (% v/v)	Tempo de sonicação (min)	Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio-padrão <sup>a</sup>				
		Fe	Ca	Mn	Zn	Mg
5 (-)	10 (-)	52 $\pm$ 2	8551 $\pm$ 257	57 $\pm$ 1	60 $\pm$ 6	7579 $\pm$ 106
20 (+)	10 (-)	50 $\pm$ 1	9083 $\pm$ 375	50 $\pm$ 1	51 $\pm$ 2	7663 $\pm$ 185
5 (-)	30 (+)	57 $\pm$ 2	8290 $\pm$ 390	57 $\pm$ 2	58 $\pm$ 4	7622 $\pm$ 171
20 (+)	30 (+)	57 $\pm$ 2	8590 $\pm$ 424	53 $\pm$ 1	56 $\pm$ 4	7711 $\pm$ 123

<sup>a</sup> Desvios padrão calculados a partir das quadruplicatas dos ensaios do planejamento fatorial



**Tabela 4.** Efeitos médios calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> aplicado na otimização da extração de Ca, Fe, Mn, Zn e Mg em chia

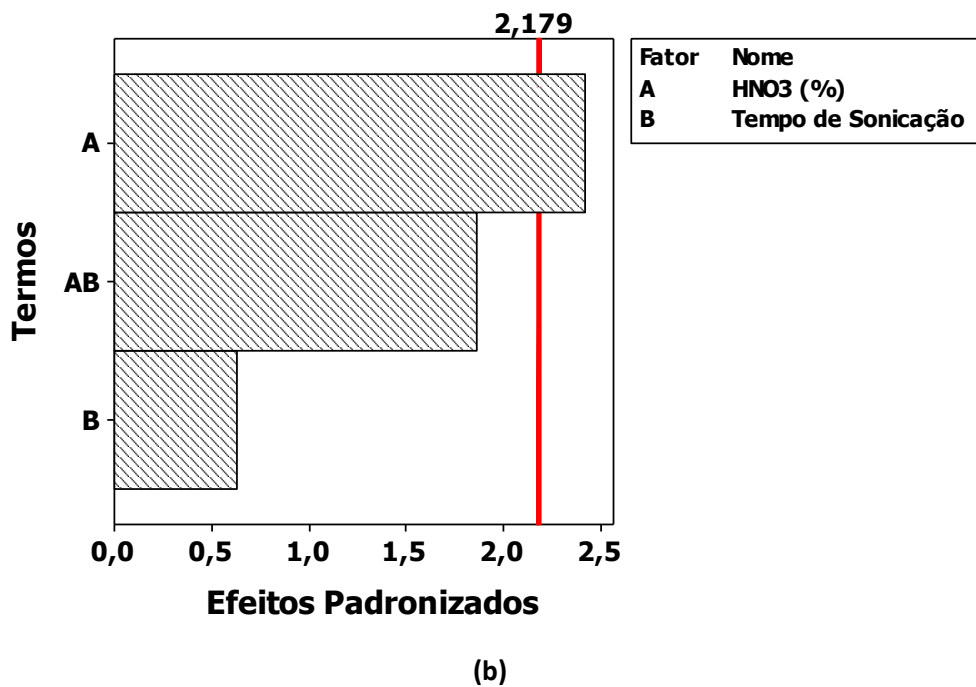
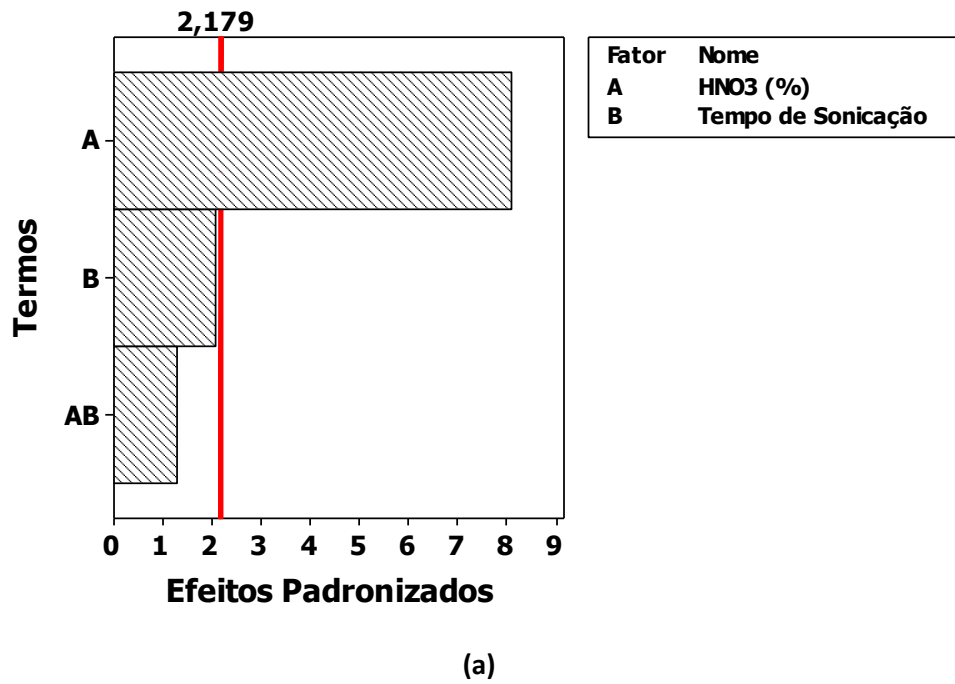
Efeitos	Estimativas ± Erro padrão <sup>a,b</sup>				
	Ca	Fe	Mn	Zn	Mg
<b>Média global</b>	8628 ± 92	54 ± 0,6	54 ± 0,3	56 ± 1	7643 ± 38
<b>Efeitos principais:</b>					
Concentração de HNO <sub>3</sub> % (v/v) (A):	416 ± 183	0,7 ± 1	-6 ± 0,7	-5 ± 2	87 ± 75
Tempo de sonicação (min.) (B):	-377 ± 183	6 ± 1	1 ± 0,7	1 ± 2	45 ± 75
<b>Efeito de Interação de dois fatores:</b> (A)X(B)	-116 ± 183	0,9 ± 1	0,9 ± 0,7	4 ± 2	3 ± 75

<sup>a</sup>O erro padrão dos efeitos foi calculado a partir dos desvios padrão apresentados na Tabela 3

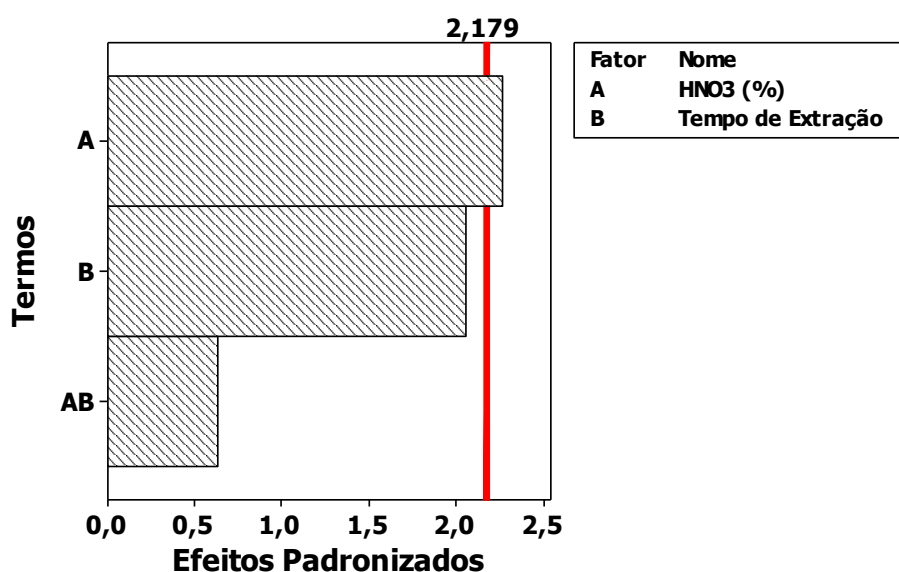
<sup>b</sup>Efeitos maiores que 2,5 para Fe; 1,5 para Mn; 4,7 para Zn, 390 para Ca e 163 para Mg são significativos no nível de 95 % de confiança

Na aplicação da extração assistida por ultrassom, como preparo de amostra para a determinação de metais em chia por F AAS, observou-se uma redução dos teores de Mn e de Zn quando a concentração de HNO<sub>3</sub> foi elevada de 5 para 20 % (v/v) (Figuras 1-a e 1-b; Tabela 4), demonstrando que soluções mais diluídas de ácido nítrico são mais recomendadas na extração destes metais da matriz da chia. Tanto a influência da concentração quanto a natureza do ácido na solução extratora são fatores críticos para a extração assistida por ultrassom de metais e são também diretamente dependentes do tipo de amostra a ser analisada.<sup>36-37</sup> A concentração do ácido é essencial no processo de extração dos metais, uma vez que o íon H<sup>+</sup>

é o responsável pelo deslocamento dos metais presentes na matriz sólida da amostra para o meio líquido extrator. Adicionalmente, a natureza do ácido empregado também pode exercer um papel importante, uma vez que o seu poder oxidante pode auxiliar na oxidação da amostra, liberando mais facilmente os metais para a solução extratora.<sup>39-40</sup> Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, outros estudos utilizando a extração assistida por ultrassom também obtiveram melhores resultados de extração quando faziam uso de soluções diluídas de ácido nítrico para a determinação de metais em farinha de trigo,<sup>41</sup> em ração animal,<sup>42</sup> em sementes oleaginosas,<sup>43</sup> em leite em pó<sup>37</sup> e em vegetais.<sup>36</sup>



**Figura 1.** Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95 % para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado na otimização da extração assistida por ultrassom de (a) Mn e (b) Zn

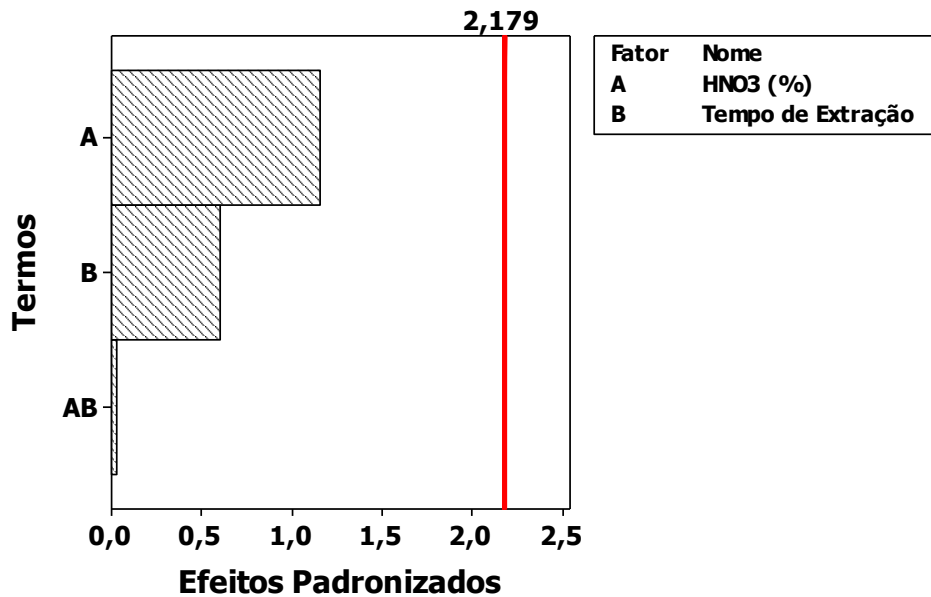


**Figura 2.** Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95 % para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado na otimização da extração assistida por ultrassom de Ca em chia

Por outro lado, o aumento da concentração de ácido nítrico da solução extratora de 5 para 20 % (v/v) foi relevante para a extração de Ca em farinha de chia (Figura 2). Este comportamento pode ser explicado devido às ligações fortes existentes entre a matéria orgânica e este elemento, já que a chia, por ser uma semente oleaginosa, tem um alto conteúdo de ácido fítico que possui características quelantes que interferem na biodisponibilidade dos minerais,<sup>44-46</sup> sendo este ácido encontrado principalmente na casca de castanhas, sementes e grãos.<sup>45</sup> Dendougui e Schwedt (2004)<sup>47</sup> em estudos *in vitro* analisaram a capacidade de ligação do cálcio ao ácido fítico em diferentes amostras de alimentos e observaram que esta é influenciada pelo pH

do meio. Portanto, os maiores teores de Ca extraídos com a solução de HNO<sub>3</sub> 20 % (v/v) podem ser atribuídos às ligações dos complexos formados entre o ácido fítico e o Ca e, por isso é necessária uma concentração mais alta do solvente extrator para uma extração mais eficiente deste elemento da matriz da chia.

Para os teores de Mg a análise do teste-*t* no nível de 95 % de confiança demonstrou que nenhum dos fatores estudados é significativo (Figura 3), pois os valores de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$  e os valores de  $p > 0,05$  e como verificado anteriormente não foi observado um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas no planejamento fatorial também para este elemento.

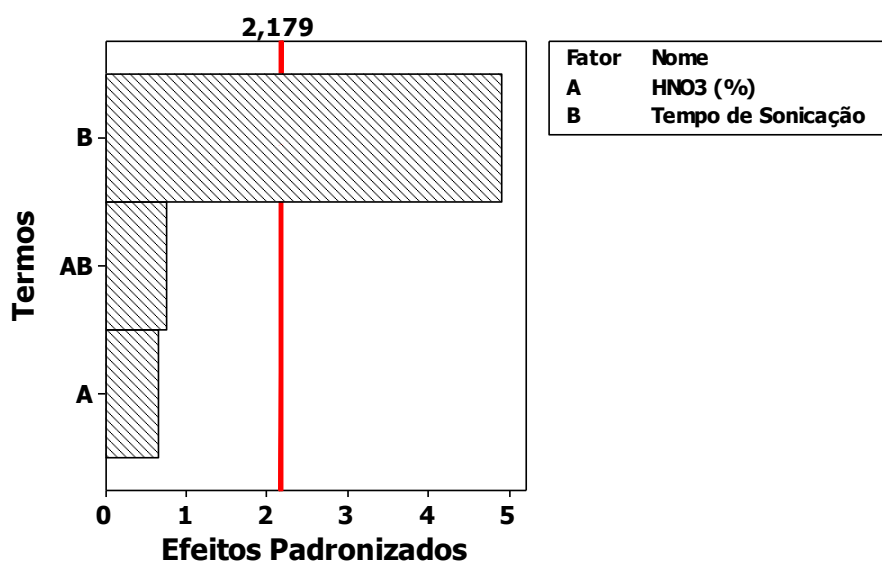


**Figura 3.** Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95 % para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado na otimização da extração assistida por ultrassom de Mg em chia

Para a extração de Fe da matriz de chia foi observado que somente o fator tempo de sonicação no banho ultrassônico foi significativo (Figura 4, Tabela 4) obtendo-se como resultados do teste-t no nível de 95 % de confiança um valor de  $t_{calculado} > t_{critico}$  e um valor de  $p < 0,05$ . Novamente, os resultados do planejamento fatorial demonstraram não haver um efeito de interação importante entre as variáveis estudadas (tempo de sonicação e concentração da solução de ácido nítrico) para a extração deste metal.

Os resultados do planejamento fatorial para o Fe foram similares aos descritos por Ferreira *et al.* (2014)<sup>44</sup> e Neves *et al.* (2009)<sup>48</sup> os quais observaram que para a extração deste metal de amostras de achocolatado em pó e de alimentos para peixe, foi necessário

manter a amostra sob sonicação por um tempo maior quando comparado ao tempo de extração adotado para outros metais presentes na matriz. Além disso, estes pesquisadores reportaram tempos maiores do que 30 minutos para a extração completa de Fe das amostras analisadas, já que provavelmente as ligações entre o ferro e a matéria orgânica são muito fortes. Como já mencionado anteriormente, a chia contém ácido fítico e ele apresenta um alto potencial quelante, complexando íons metálicos, tanto em solução quanto no estado sólido, e interagindo fortemente com os íons Fe (II) e Fe (III) dependendo do valor de pH da amostra.<sup>48</sup> Em vista deste comportamento tempos maiores do que 30 minutos podem ser necessários para a completa extração de Fe da matriz de chia.



**Figura 4.** Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95 % para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado na otimização da extração assistida por ultrassom de Fe em chia

Para verificar se os teores de Fe determinados pela extração assistida por ultrassom, considerando a aplicação da solução extratora de ácido nítrico de 5 % (v/v) e tempos de sonicação de 30 minutos eram concordantes com os obtidos pelo método de referência (digestão por via úmida) a amostra FC4 foi submetida aos dois métodos de preparo de amostra. Para a digestão por via úmida foram obtidos teores de Fe de  $100 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$  os quais foram muito superiores aos determinados pela extração assistida por ultrassom ( $57 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ ), corroborando com os resultados do planejamento fatorial de que tempos maiores do que 30 minutos são necessários para a extração completa do elemento da matriz de chia.

Finalmente, a partir dos resultados da otimização multivariada pode-se sugerir que a concentração de solução extratora de  $\text{HNO}_3$  5 % (v/v) e 30 minutos de sonicação por ultrassom podem ser recomendadas para a extração assistida por ultrassom de Mn, Zn e Mg de sementes e de farinhas de chia. Para Fe os resultados do planejamento fatorial indicaram a necessidade de um estudo mais aprofundado do efeito do tempo de sonicação nos teores extraídos deste elemento da matriz

da chia. Por outro lado, para Ca verificou-se a necessidade de utilizar-se uma solução extratora mais concentrada de ácido nítrico (20 %, v/v) para tornar mais eficiente o processo de extração deste elemento. Visando obter uma metodologia de extração assistida por ultrassom que permitisse o uso das mesmas condições experimentais para a extração de vários elementos adotou-se como condições ótimas, em virtude dos resultados do planejamento fatorial, uma solução extratora diluída de ácido nítrico 5 % (v/v) e um tempo de sonicação de 30 minutos para a determinação de Mg, Mn e Zn. Posteriormente, as condições estabelecidas como ótimas foram aplicadas na amostra FC4 para a determinação destes elementos e os resultados foram comparados com os determinados pelo método de referência (digestão por via úmida) (Tabela 5).

Previamente a aplicação dos dois métodos de preparo de amostra foi realizado um estudo do tamanho de partículas, pois observou-se durante a realização dos ensaios do planejamento fatorial que havia uma grande dispersão nas réplicas de cada um dos experimentos, exigindo dessa forma um número maior de repetições para assegurar

maior confiabilidade aos dados (Tabela 3). A amostra de farinha de chia (FC4) utilizada no estudo de otimização, embora estivesse moída, não apresentava uma homogeneidade no tamanho de partículas. É reconhecido na literatura que o tamanho de partículas tem uma grande influência na eficiência da extração assistida por ultrassom, em que tamanhos menores favorecem a interação do solvente extrator com o sólido e dessa forma aumentam as taxas de extração do analito de interesse.<sup>19-21</sup> Em vista disso, a farinha de chia FC4 foi moída e peneirada até atingir um tamanho de partículas < 425  $\mu\text{m}$ .

Na extração assistida por ultrassom a escolha do tamanho de partículas é dependente da composição da matriz, das interações do analito com a matriz do alimento, da razão sólido/líquido, entre outras variáveis<sup>16</sup> e por isso vários autores têm reportado diferentes tamanhos de partículas em função da natureza da amostra investigada.<sup>40,42,48</sup> Entretanto, para sementes oleaginosas como a chia observa-se a aglomeração do pó e liberação de óleo no meio extrator quando o tamanho das

partículas é muito reduzido. Este comportamento torna-se bem evidente quando se comparam os resultados apresentados nas Tabelas 3, 5 e 8 para a amostra de farinha FC4, em que se observa uma similaridade e repetitividade dos resultados mostrados nas tabelas 5 e 8 em relação aos apresentados na Tabela 3 em que a farinha de chia foi avaliada sem moagem e peneiramento. De acordo com Raes *et al.* (2014)<sup>49</sup> deve-se salientar também que em relação a sementes a distribuição dos metais pode ser diferente na casca e no interior das mesmas e, portanto o tamanho de partículas se torna um parâmetro muito importante a ser otimizado quando se faz uso dos métodos de preparo de amostra avaliados neste trabalho de modo que haja uma boa distribuição de todos os componentes da matriz na massa a ser pesada. Assim, para obter-se uma razão entre eficiência e interferência no processo de extração assistida por ultrassom foram utilizados tamanhos de partículas < 425  $\mu\text{m}$  para a comparação apresentada na Tabela 5 e no estudo de validação da metodologia.

**Tabela 5.** Comparação dos métodos de preparo de amostra para a determinação de Mn, Zn e Mg em chia por F AAS. Resultados expressos como médias  $\pm$  desvio padrão

Metal	Preparo de Amostra		Teste-t <sup>b</sup>	
	Digestão por via úmida ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Extração assistida por ultrassom ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$t_{\text{calculado}}$	$p$ valor
Mn	42,60 $\pm$ 0,63	42,28 $\pm$ 0,08	1,32	0,258
Zn	46,64 $\pm$ 1,31	48,36 $\pm$ 0,99	1,91	0,129
Mg	4035 $\pm$ 42,3	4136,7 $\pm$ 32,3	3,15	0,088

<sup>a</sup> Valores de medidas em triplicata expressos como médias e desvios-padrão em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; <sup>b</sup> valor de  $t_{\text{crítico}(0,025; 3)} = 4,303$

Aos resultados da Tabela 5 foi aplicado um teste-t no nível de 95 % de confiança para a comparação do método proposto de preparo de amostra (extração assistida por ultrassom) com o método de referência (digestão por via úmida). A análise do teste-t sugeriu que os métodos de preparo de amostra não têm

diferenças significativas no nível de 95 % de confiança com valores de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$  e valores de  $p > 0,05$  para os elementos analisados.

Em outras palavras, as condições determinadas no planejamento fatorial para a extração assistida por ultrassom foram ótimas

para a extração de Mn, Zn e Mg em amostras de chia e estas foram posteriormente adotadas para o estudo de validação da determinação destes metais em farinhas e em sementes de chia por F AAS.

### 3.2. Estudo de validação

O estudo de validação do procedimento otimizado de extração assistida por ultrassom de Mn, Zn e Mg das sementes e das farinhas de chia foi realizado de acordo com as recomendações de guias orientativos da AOAC,<sup>32</sup> Inmetro,<sup>31</sup> Anvisa<sup>30</sup> e NATA<sup>33</sup> e de artigos da literatura<sup>26-28</sup> avaliando-se os parâmetros de faixa de trabalho, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão.

#### 3.2.1. Linearidade e curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas por três métodos de padronização. Uma curva analítica de padronização externa em solução aquosa (PE), uma curva analítica de simulação do meio extrator com dissolução dos padrões metálicos em solução de ácido nítrico 5 % (v/v) (ME\_5 %) e uma curva analítica de simulação do meio extrator com dissolução dos padrões em solução de ácido nítrico 20 % (v/v) (ME\_20 %). Os dados referentes às três curvas analíticas de cada metal são apresentados na Tabelas 6, nas Figuras 5 e 6 e foram utilizados para a avaliação da linearidade.

A comparação entre as inclinações das curvas de padrão externo (PE) e de simulação de meio extrator (ME\_5 % e ME\_20 %) (Tabela 6

e Figuras 5 e 6) demonstraram que não há influência significativa dos meios extratores compostos pelas soluções diluídas de ácido nítrico (5 e 20 % (v/v)) nas concentrações dos metais extraídos e avaliados pelo planejamento fatorial (Tabela 3) e que as curvas de padronização externa podem ser utilizadas para a quantificação dos metais Ca, Fe, Mg, Mn e Zn.

O parâmetro de linearidade permite verificar a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico.<sup>30-33</sup> A linearidade do método proposto foi avaliada pela aplicação da técnica de regressão linear e pelo teste de falta de ajuste no nível de 95 % de confiança.<sup>26</sup>

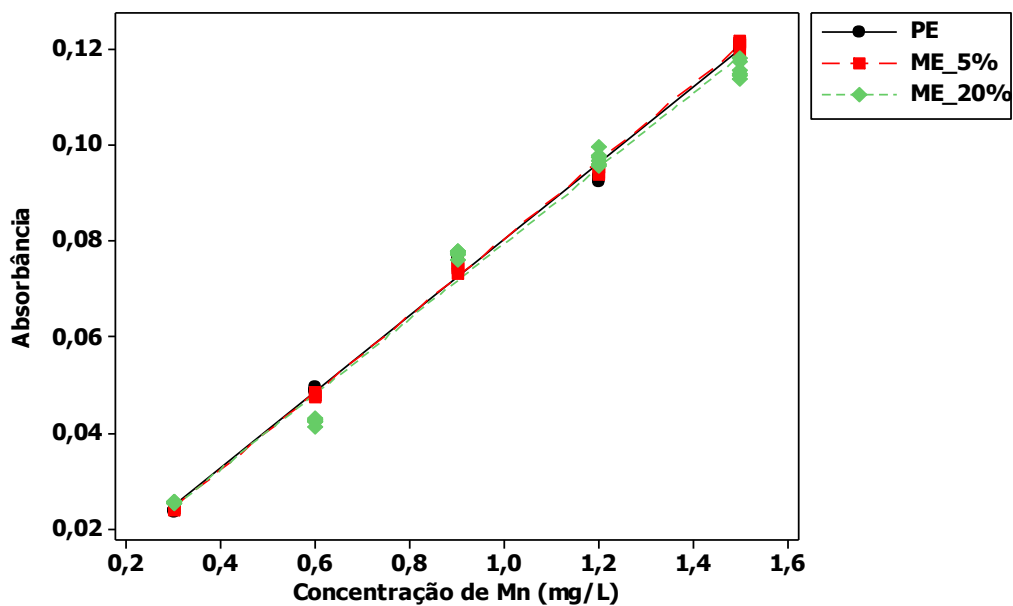
Os resultados da análise de regressão linear para a avaliação da linearidade das curvas analíticas de padrão externo para os metais Mn, Zn e Mg (Tabela 7) sugeriram que esta é altamente significativa (valores de  $F_{reg} \gg F_{crítico}$  e valores de  $p < 0,05$ ). Além disso, o coeficiente de correlação linear demonstrou haver uma possível relação linear entre a absorbância e a concentração.<sup>26,31</sup> Valores similares aos determinados neste trabalho para os coeficientes de correlação das curvas analíticas de Mn ( $r \geq 0,999$ ), Mg ( $r \geq 0,990$ ) e Zn ( $r \geq 0,999$ ) foram reportados por outros autores.<sup>40-42</sup> Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) que determinam a variabilidade dos dados experimentais apresentaram valores elevados indicando que mais de 98 % da variabilidade nos dados das curvas analíticas é explicada pelo modelo linear e sugerindo que menos de 2 % da variação é explicada pelos resíduos.<sup>51</sup>

**Tabela 6.** Parâmetros das curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação do meio extrator (ME)

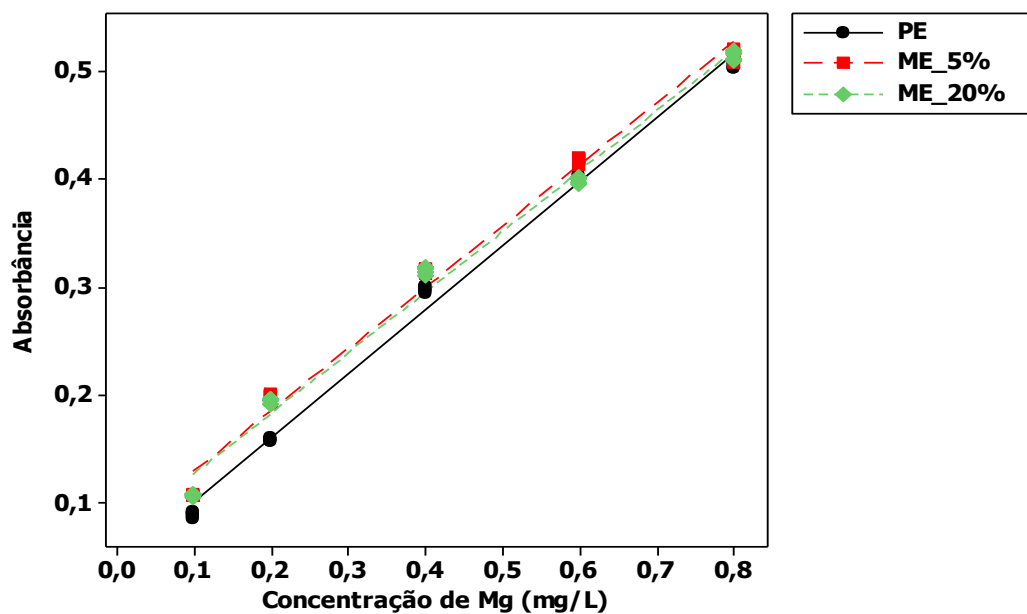
Metal	Método de Padronização <sup>a</sup>	Parâmetros da Regressão Linear			
		Equação da Reta <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>	F <sub>reg</sub> <sup>c</sup>	p
Mn	PE	A = 0,00113 + 0,0793 [Mn] ± (0,0022)	99,5	5583	0,000
	ME_5 %	A = 0,00024 + 0,0803 [Mn] ± (0,0012)	99,9	20023	0,000
	ME_20 %	A = 0,00105 + 0,0784 [Mn] ± (0,0037)	98,5	1874	0,000
Zn	PE	A = 0,0114 + 0,247 [Zn] ± (0,0093)	99,0	2952	0,000
	ME_5 %	A = 0,0213 + 0,236 [Zn] ± (0,0091)	99,0	2822	0,000
	ME_20 %	A = 0,0300 + 0,226 [Zn] ± (0,0075)	99,2	3795	0,000
Ca	PE	A = 0,00125 + 0,231[Ca] ± (0,0049)	99,7	9307	0,000
	ME_5 %	A = 0,0157 + 0,222 [Ca] ± (0,0058)	99,5	6124	0,000
	ME_20 %	A = 0,0206 + 0,226 [Ca] ± (0,0062)	99,5	5561	0,000
Fe	PE	A = -0,00283 + 0,0870 [Fe] ± (0,0044)	98,3	1630	0,000
	ME_5 %	A = -0,00637 + 0,0970 [Fe] ± (0,0025)	99,5	5891	0,000
	ME_20 %	A = 0,00442 + 0,0823 [Fe] ± (0,0016)	99,7	11541	0,000
Mg	PE	A = 0,0406 + 0,0595 [Mg] ± (0,0168)	99,4	5239	0,000
	ME_5 %	A = 0,0720 + 0,0569 [Mg] ± (0,0225)	98,9	2688	0,000
	ME_20 %	A = 0,0707 + 0,0561 [Mg] ± (0,0218)	99,0	2766	0,000

<sup>a</sup> PE = curva analítica de padrão externo, ME\_5 % e ME\_20 % = curvas de simulação do meio extrator em solução de ácido nítrico 5 e 20 % (v/v); <sup>b</sup> valores entre parêntesis representam os intervalos de confiança da inclinação das curvas analíticas; <sup>c</sup> F<sub>crítico (0,05;1,8)</sub> = 5,32 e F<sub>reg</sub> = valor de F para a regressão

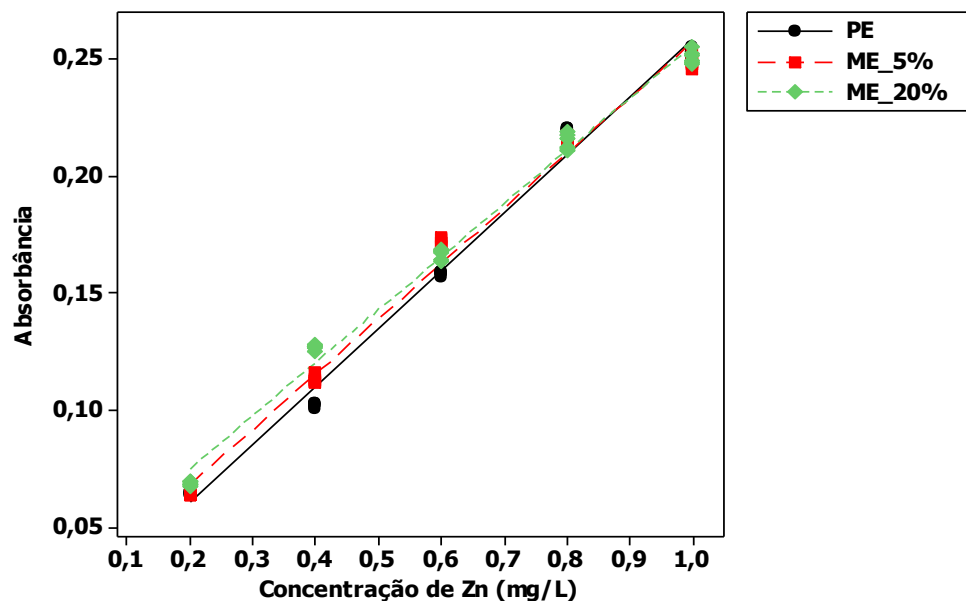




(a)

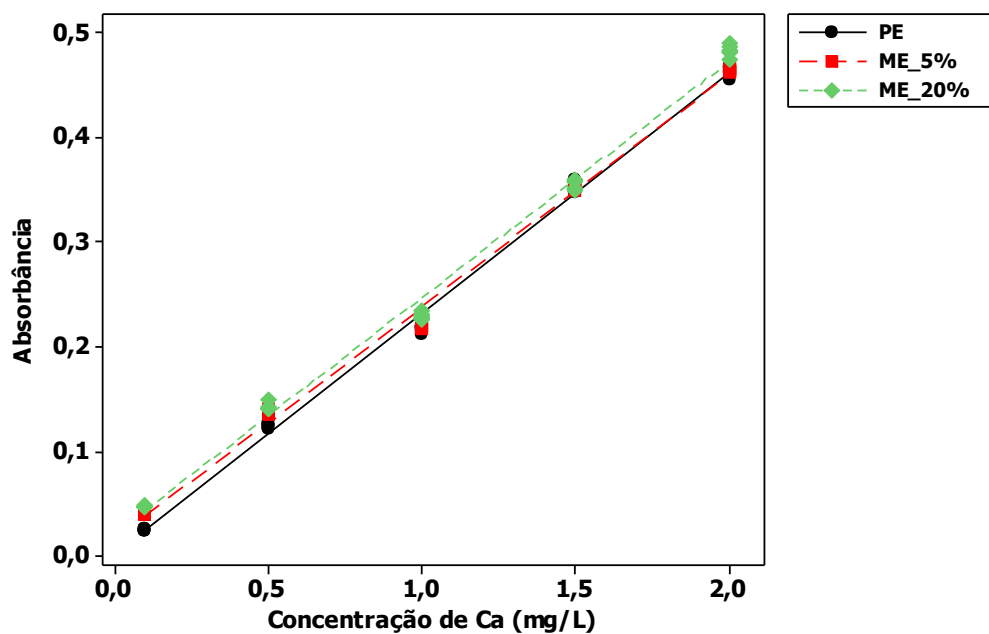


(b)

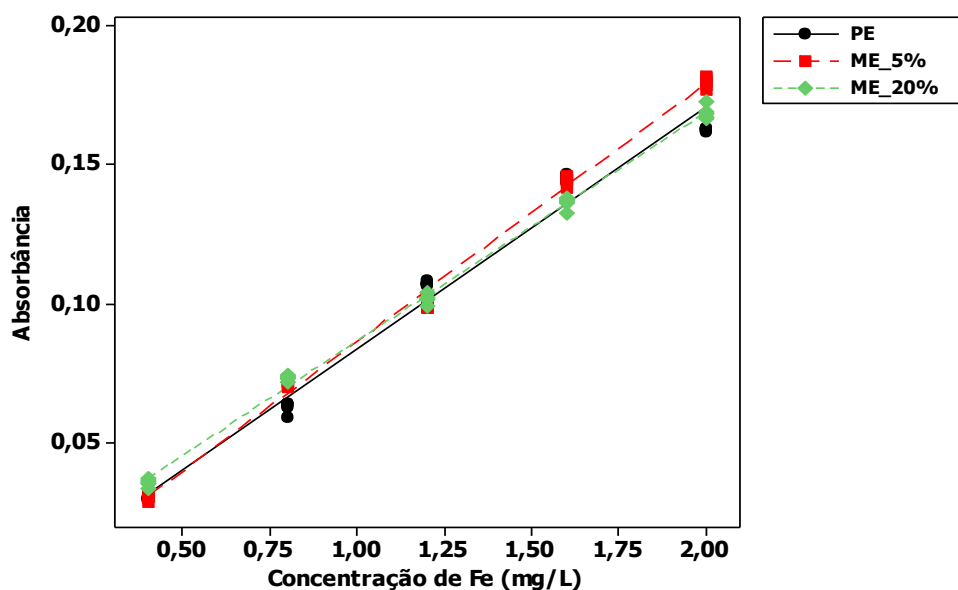


(c)

**Figura 5.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação do meio extrator em solução de ácido nítrico 5 % (v/v) (ME\_5 %) e em solução de ácido nítrico 20 % (v/v) (ME\_20 %) para os metais (a) Mn, (b) Mg e (c) Zn



(a)



(b)

**Figura 6.** Curvas analíticas de padrão externo (PE) e de simulação do meio extrator em solução de ácido nítrico 5 % (v/v) (ME\_5 %) e em solução de ácido nítrico 20 % (v/v) (ME\_20 %) para os metais (a) Ca e (b) Fe

**Tabela 7.** Avaliação da linearidade das curvas analíticas de padrão externo para os metais Mn, Zn e Mg

Metal	Parâmetros da regressão		Regressão <sup>a</sup>				Falta de ajuste <sup>b</sup>	
	Equação	r	R <sup>2</sup>	F <sub>obs</sub>	p-valor	F <sub>faj</sub>	p-valor	
Mn	A = 0,0008+0,145[Mn] (±0,004)	0,998	99,6	1861,43	0,000	2,24	0,201	
Zn	A = 0,0284+ 0,377[Zn] (±0,016)	0,991	98,2	442,79	0,000	1,88	0,251	
Mg	A = 0,0098+ 1,14[Mg] (±0,015)	0,999	99,8	3365,61	0,000	0,27	0,847	

<sup>a</sup>F<sub>crítico (0,05;1,8)</sub> = 5,32; <sup>b</sup>F<sub>crítico(0,05; 3, 5)</sub> = 5,41.

Para verificar se o modelo linear gerado se ajustava bem aos dados experimentais foi aplicado um teste de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) no nível de 95 % de confiança. Os resultados indicaram que para todas as curvas analíticas os valores de  $F_{faj}$  foram inferiores ao valor de  $F_{critico}$  e valores de  $p > 0,05$ . Assim pode-se concluir que a regressão linear é altamente

significativa para todas as curvas analíticas estudadas, sem falta de ajuste do modelo linear. Portanto, pode-se afirmar que as curvas analíticas apresentaram linearidade na faixa de concentração investigada e podem ser utilizadas para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e em farinhas de chia.

### 3.2.2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Para avaliar se o método proposto possibilitaria a determinação de Mn, Zn e Mg por F AAS nas amostras de sementes e de farinhas de chia em baixas concentrações foram calculados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O LD é a menor quantidade do analito presente em uma

amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, enquanto o LQ representa a menor concentração do analito que o equipamento pode quantificar com precisão e exatidão aceitáveis.<sup>30-31</sup> Os valores de LD e de LQ foram calculados utilizando-se os dados da curva analítica. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Limites de detecção e de quantificação obtidos para Mn, Zn e Mg em sementes e em farinhas de chia por F AAS

Limites de detecção e de quantificação (mg L <sup>-1</sup> / µg g <sup>-1</sup> )					
Metal	Extração Assistida por Ultrassom		Digestão por Via Úmida		Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )
	LD	LQ	LD	LQ	
Mn	0,02 / 0,8	0,06 / 3	0,07 / 4	0,2 / 12	0,3 - 1,5
Zn	0,04 / 2	0,2 / 6	0,09 / 5	0,3 / 15	0,2 - 1,0
Mg	0,02 / 1,0	0,06 / 3	0,06 / 3	0,2 / 9	0,1 - 0,8

Os valores de LQ do método de extração assistida por ultrassom variaram de 0,06 a 0,2 mg L<sup>-1</sup> (3 a 6 µg g<sup>-1</sup>) seguindo a sequência Mn = Mg < Zn, e o mesmo comportamento foi observado para os valores de LD, os quais variaram de 0,02 a 0,04 mg L<sup>-1</sup> (0,8 a 2 µg g<sup>-1</sup>). Outros autores reportaram valores similares para os limites de quantificação quando a extração assistida por ultrassom foi aplicada como método de preparo de amostra e a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) foi adotada como técnica de detecção de metais em diferentes matrizes. Priego-Capote e Castro (2004)<sup>42</sup> na extração de Mg e Zn de ração animal determinaram valores de LQ de 15 e 13 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente. De forma semelhante, Neves *et al.* (2009)<sup>47</sup> encontraram limites de quantificação de 4,2, 1,4 e 2,1 µg g<sup>-1</sup> para a extração de Mg, Mn e Zn, respectivamente em ração para peixes enquanto Barros *et al.* (2013)<sup>52</sup> determinaram valores de LQ de 4,5 e 9,7 µg g<sup>-1</sup> para a extração de Mn e Zn de ração para frangos. Todavia, Peronico e Raposo Jr

(2016),<sup>40</sup> na extração de Cu, Mn, Ca e Mg de sementes oleaginosas encontraram valores de LQ de 417 µg g<sup>-1</sup> e 3,5 mg g<sup>-1</sup> para Mn e Mg, os quais foram bem superiores aos determinados neste estudo.

Uma vez que os valores dos limites de detecção e de quantificação para o procedimento de extração desenvolvido neste trabalho foram inferiores ao primeiro ponto das curvas analíticas assume-se que os mesmos podem ser quantificados com precisão e exatidão adequadas na faixa linear das concentrações investigadas. Por outro lado, a digestão por via úmida, adotada como método de referência apresentou valores de LD (3 a 5 µg g<sup>-1</sup>) e LQ (9 a 15 µg g<sup>-1</sup>) superiores aos obtidos pelo método de extração assistida por ultrassom (LD entre 0,8 a 2 µg g<sup>-1</sup> e LQ entre 3 e 6 µg g<sup>-1</sup>).

Os valores de LD e de LQ da digestão por via úmida para Zn e Mg foram superiores ao primeiro ponto das curvas analíticas destes metais, demonstrando a dificuldade deste

método de preparo de amostra em quantificar estes analitos em baixas concentrações. As possíveis razões para este comportamento são a utilização de quantidades elevadas de reagentes (ácidos e oxidantes), de longos tempos de aquecimento, o que pode levar a contaminação dos brancos analíticos e ao aumento dos limites de detecção e de quantificação.<sup>24</sup> É importante ressaltar que os limites de quantificação do método de extração assistida por ultrassom desenvolvido neste estudo apresentaram valores inferiores aos do método de referência possivelmente por limitar o uso de reagentes em altas concentrações e por não utilizar peróxido de hidrogênio, diminuindo a possibilidade de contaminação dos brancos analíticos e aumentando a sensibilidade da metodologia.

### 3.2.3. Exatidão e precisão

Na Tabela 9 são apresentadas as concentrações médias e os desvios padrão dos teores de Mn, Zn e Mg nas amostras de sementes e de farinhas de chia utilizando o método de referência (digestão por via úmida) e o método proposto de extração assistida por ultrassom. Testes estatísticos como o teste-*t* pareado, a regressão linear e o teste-*F* de comparação de variâncias ponderadas foram aplicados aos teores destes metais em amostras de chia determinados aplicando-se os dois métodos de preparo de amostra e a técnica de F AAS.

Para verificar a confiabilidade do método desenvolvido neste trabalho foi realizado o estudo de precisão por meio da comparação das variâncias ponderadas do método de referência (digestão por via úmida) e da extração assistida por ultrassom, aplicando-se um teste-*F* apropriado, utilizando-se diferentes amostras de sementes e de farinhas de chia. Além disso, foi avaliada a repetitividade expressa em desvios padrão relativos (RSD (%)), e os resultados são apresentados na Tabela 10.

Uma das formas de avaliar a precisão adotada neste trabalho consistiu na aplicação de um teste-*F* que considera a razão entre as

variâncias amostrais ponderadas do método proposto e do método de referência, juntamente com os intervalos de confiança para a razão entre as variâncias.<sup>34</sup> Os resultados da análise do teste-*F* sugerem que não existem diferenças significativas entre a precisão do método proposto em relação a do método de referência para a determinação de Zn e Mg, considerando-se que os valores de  $F_{calculado}$  foram inferiores ao valor de  $F_{critico}$ , com  $p > 0,05$ . Por outro lado, o resultado do teste-*F* para a determinação de Mn sugere que existem diferenças significativas entre a precisão do método de referência (digestão por via úmida) e o método proposto (extração assistida por ultrassom), pois o valor de  $F_{calculado} > F_{critico}$  com valor de  $p < 0,05$  e o intervalo de confiança para a razão das variâncias ponderadas apresentou limite inferior maior que 1,0 (Tabela 10).

Para verificar se a extração assistida por ultrassom seria um método de preparo de amostra mais preciso do que o método de referência (digestão por via úmida) foi aplicado o teste-*F* de comparação das variâncias ponderadas monocaudal.<sup>35</sup> Os resultados deste teste demonstraram que a extração assistida por ultrassom tem menores desvios padrão ponderados do que os apresentados pelo método de referência, pois o valor do  $F_{calculado} = 14,7$  é maior do que o valor do  $F_{critico (0,05;13,13)} = 2,62$  com  $p < 0,05$ . Desta forma, pode-se confirmar que o método de extração assistida por ultrassom apresenta precisão adequada para a determinação de Zn e Mg e melhor precisão para a determinação de Mn em amostras de sementes e de farinhas de chia por F AAS. As diferenças de precisão observadas entre os métodos de preparo de amostra podem ser explicadas pelo fato da digestão por via úmida apresentar maior manipulação da amostra e fazer uso de aquecimento em altas temperaturas o que pode ocasionar de forma aleatória perdas do analito por volatilização ou por adsorção nos frascos devido ao elevado tempo de digestão, a distribuição heterogênea de calor entre os frascos durante o aquecimento e à necessidade de grandes volumes de reagentes aumentando os desvios padrão do método de referência.<sup>14</sup>

**Tabela 9.** Teores médios e respectivos desvios padrão (DP) de Mn, Zn e Mg nas amostras de sementes e de farinhas de chia determinados pelo método de referência e pela extração assistida por ultrassom

Concentração média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ DP <sup>a,b</sup>						
Amostra	Mn		Zn		Mg	
	Digestão por Via Úmida	Extração Assistida por Ultrassom	Digestão por Via Úmida	Extração Assistida por Ultrassom	Digestão por Via Úmida	Extração Assistida por Ultrassom
SC1	65,32 $\pm$ 4,11	63,09 $\pm$ 0,73	44,43 $\pm$ 0,51	45,83 $\pm$ 0,60	4283 $\pm$ 179	4430 $\pm$ 320
SC2	34,16 $\pm$ 0,24	34,26 $\pm$ 0,16	72,58 $\pm$ 3,23	83,04 $\pm$ 3,19	3898 $\pm$ 426	3600 $\pm$ 5,4
SC3	61,22 $\pm$ 0,60	63,16 $\pm$ 0,46	80,52 $\pm$ 6,47	70,57 $\pm$ 0,34	4048 $\pm$ 42	4072 $\pm$ 58
SC4	26,11 $\pm$ 0,45	28,53 $\pm$ 0,11	77,40 $\pm$ 0,61	75,02 $\pm$ 0,02	3384 $\pm$ 25	3425 $\pm$ 58
SC5	36,97 $\pm$ 0,04	40,49 $\pm$ 0,31	54,86 $\pm$ 1,20	76,69 $\pm$ 1,46	4741 $\pm$ 0,8	4456 $\pm$ 250
SC6	34,22 $\pm$ 0,04	38,01 $\pm$ 0,26	55,48 $\pm$ 0,36	55,88 $\pm$ 1,20	4032 $\pm$ 86	3615 $\pm$ 29
SC7	95,58 $\pm$ 3,14	82,58 $\pm$ 0,52	79,30 $\pm$ 1,51	77,81 $\pm$ 1,54	4371 $\pm$ 46	4454 $\pm$ 2,4
SC8	49,19 $\pm$ 1,40	47,49 $\pm$ 0,53	74,71 $\pm$ 0,16	74,20 $\pm$ 4,83	3877 $\pm$ 20	3819 $\pm$ 104
FC1	49,98 $\pm$ 0,54	52,54 $\pm$ 0,67	52,51 $\pm$ 2,55	55,85 $\pm$ 0,65	4425 $\pm$ 8,0	4450 $\pm$ 47
FC2	72,75 $\pm$ 1,52	71,80 $\pm$ 0,44	79,30 $\pm$ 1,51	77,81 $\pm$ 1,54	3416 $\pm$ 81	3452 $\pm$ 67
FC3	65,33 $\pm$ 1,07	73,40 $\pm$ 0,19	79,86 $\pm$ 1,49	76,78 $\pm$ 0,19	4312 $\pm$ 268	4369 $\pm$ 46
FC4	42,35 $\pm$ 0,36	42,29 $\pm$ 0,01	45,85 $\pm$ 0,47	49,09 $\pm$ 0,36	4035 $\pm$ 42	4154 $\pm$ 32
FC5	30,98 $\pm$ 0,11	32,98 $\pm$ 0,29	93,64 $\pm$ 1,00	98,79 $\pm$ 0,91	3648 $\pm$ 151	3390 $\pm$ 69

<sup>a</sup> Os desvios padrão foram calculados a partir da realização de ensaios em duplicata de cada um dos métodos de preparo de amostra

**Tabela 10.** Dados do estudo de precisão (teste-F e intervalos de confiança) do método de referência e da extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em farinhas e em sementes de chia

Metal	Estimativas de Precisão			Repetitividade	
	$F_{calculado}$	$p$ -valor	Intervalo de confiança	(RSD%) Experimental	(RSD%) Recomendado
Mn	14,7	0,000	5 – 46	1	5,3
Zn	1,6	0,420	0,5 – 5	3,8	5,3
Mg	1,2	0,729	0,4 – 4	3,3	3,7

$$F_{critico (0,05;13;13)} = 3,18$$

As estimativas de repetitividade também foram consideradas apropriadas para todos os metais estudados, uma vez que os valores encontrados de RSD (%) foram inferiores aos valores recomendados pela AOAC na faixa de concentrações investigada.<sup>32</sup> Outros autores reportaram valores de RSD similares para a estimativa de repetitividade quando a extração assistida por ultrassom e a técnica de F AAS foram utilizadas. Barros *et al.* (2013)<sup>52</sup> encontraram valores de RSD de 2 e 0,8 % para a extração de Mn e Zn em ração de frangos. Neves *et al.* (2009)<sup>48</sup> na extração de Ca, Mg, Mn e Zn de ração para peixes determinaram valores de RSD < 3 %. Priego-Capote e Castro (2004)<sup>42</sup> obtiveram valores de RSD entre 2 e 6 % para a extração de Ca, Mg, Cu, Fe e Zn de ração animal. Perônico e Raposo Jr (2016)<sup>40</sup> na extração de Cu, Mn, Ca e Mg de sementes oleaginosas determinaram valores de RSD

entre 0,5 e 6 %. Desta forma, pode-se sugerir que o preparo de amostra utilizando a extração assistida por ultrassom desenvolvido neste trabalho apresentou precisão adequada para a determinação de Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia por F AAS.

A exatidão foi avaliada por meio da comparação dos teores de Mn, Zn e Mg determinados pelo método de referência com os valores obtidos pela extração assistida por ultrassom, realizando-se a aplicação de testes estatísticos (teste-t pareado e a análise de regressão linear) no nível de 95 % de confiança. Na Tabela 11 são apresentados os dados da comparação dos métodos de preparo para diferentes amostras de sementes e de farinhas de chia.

**Tabela 11.** Resultados da avaliação da exatidão do método de extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e em farinhas de chia

Metal	Teste-t pareado		
	$t_{calculado}$	$p$ -valor	Intervalos de confiança para a determinação das médias
Mn	0,5	0,617	(-2) - 1,5
Zn	1,4	0,179	(-5) - 1
Mg	1,4	0,178	(-29) - 150

$$t_{critico (0,025; 13)} = 2,160$$

A análise do teste-t pareado (Tabela 11) sugere que não existem diferenças significativas no nível de 95 % de confiança entre os teores de Mn, Zn e Mg determinados pela extração assistida por ultrassom em relação aos resultados encontrados pelo método de referência, pois os valores de  $t_{calculado}$  foram menores do que o valor de  $t_{critico}$  com valores de  $p > 0,05$ .

A exatidão do método de preparo de amostra usando a extração assistida por ultrassom também foi avaliada pela técnica de regressão linear aplicada aos resultados apresentados na Tabela 12. Esta técnica

permite identificar a presença de erros sistemáticos, os quais podem afetar a exatidão dos métodos comparados.<sup>35</sup>

Os resultados apresentados na Tabela 12 demonstraram que os modelos lineares para Mn, Zn e Mg são adequados e os teores destes metais apresentaram uma correlação linear entre os métodos de preparo de amostra avaliados (método de referência e a extração assistida por ultrassom), o que pode ser confirmado pelos elevados valores de  $F_{regressão}$ , que variaram entre 583 e 40 com valores de  $p < 0,05$ .

**Tabela 12.** Dados da análise de regressão linear no nível de 95 % de confiança para a avaliação da exatidão da extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em chia por F AAS

Metal	$F_{regressão}$	$p$ -valor	Coefficiente da reta de regressão $\pm$ Erro padrão	$t_{observado}$	$p$ -valor
Mn	213 <sup>a</sup>	0,000	Inclinação: 1,1 $\pm$ 0,1	14,6 <sup>b</sup>	0,000
			Intercepto: -6,4 $\pm$ 4,2	1,6 <sup>b</sup>	0,150
Zn	37 <sup>a</sup>	0,000	Inclinação: 0,9 $\pm$ 0,2	6,1 <sup>b</sup>	0,000
			Intercepto: 3,1 $\pm$ 11	0,3 <sup>b</sup>	0,781
Mg	50 <sup>a</sup>	0,000	Inclinação: 1,0 $\pm$ 0,1	7,1 <sup>b</sup>	0,000
			Intercepto -44 $\pm$ 572	0,1 <sup>b</sup>	0,940

<sup>a</sup> $F_{critico(0,05;1,13)} = 4,67$ ; <sup>b</sup> $t_{critico(0,025;13)} = 2,160$

Para verificar a significância dos coeficientes da regressão linear (intercepto e inclinação) foi aplicado um teste-t aos mesmos, no mesmo nível de confiança. Os resultados indicaram que as inclinações das retas de regressão para todos os metais investigados são estatisticamente iguais a 1,0, pois os valores de  $t_{calculado}$  foram maiores do que o valor de  $t_{critico}$  com valores de  $p < 0,05$ .

A avaliação do intercepto sugere que não havia significância estatística destes, já que os valores de  $t_{calculado}$  foram menores do que os

valores de  $t_{critico}$  com valores de  $p > 0,05$ . Estes resultados comprovaram que ambos os métodos de preparo de amostras (digestão por via úmida e a extração assistida por ultrassom) não são afetados de forma significativa por erros sistemáticos. A partir destes resultados pode-se sugerir que a extração assistida por ultrassom, como método de preparo de amostra, apresentou uma boa exatidão para determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e em farinhas de chia por F AAS.



## 4. Conclusão

A extração assistida por ultrassom como método de preparo de amostra para a determinação de Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e farinhas de chia por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) mostrou-se adequada já que os parâmetros avaliados no estudo de validação (linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão) encontraram-se dentro dos critérios recomendados pela literatura.

É importante ressaltar que a aplicação do planejamento fatorial permitiu a otimização do método de extração assistida por ultrassom para a determinação de Mn, Zn e Mg em sementes e em farinhas de chia por F AAS, estabelecendo como condições ótimas um tempo de sonicação igual a 30 minutos, uma concentração de solução extratora de HNO<sub>3</sub> de 5 % (v/v), uma massa de amostra de 0,5 g e uma frequência de sonicação de 42 kHz.

Em vista disso pode-se afirmar que a extração assistida por ultrassom é vantajosa em relação ao método de referência (digestão por via úmida) devido principalmente a sua simplicidade, rapidez, baixo custo operacional e impacto ambiental para a determinação de Mn, Zn e Mg em amostras de sementes e de farinhas de chia por F AAS. Além disso, é importante ressaltar que este método de preparo de amostra apresenta uma valiosa contribuição para a química verde, pois faz uso de pequenos volumes de reagentes gerando menos resíduos perigosos e tóxicos, proporcionando maior segurança para o analista, já que não faz uso de temperaturas elevadas e adotando instrumentação de menor custo. Finalmente, a extração assistida por ultrassom produz resultados precisos e exatos, fatos que tornam atrativa a implantação desta metodologia de preparo de amostra em laboratórios de controle de qualidade, e de órgãos de fiscalização de alimentos.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Gonzalez, G. PROYECTO UTF/ARG/017/ARG, 2014. Disponível em < [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/r lc/utf017arg/valles\\_calchaquies/08.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/r lc/utf017arg/valles_calchaquies/08.pdf) > Acesso em 10 de junho de 2019.
- <sup>2</sup> Norlaily, M. A.; Swee, K. Y.; Wan, Y. H.; Boon, K.B.; Sheau, W. T.; Soon, T. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, 2012, 1. [CrossRef]
- <sup>3</sup> Coates, W. *Chia: the complete Guide to the ultimate superfood*. Sterling Publishing Eds. New York, 2002. [CrossRef]
- <sup>4</sup> Caldeira, D.; Vilardo, L.; *Alimentos funcionais: A prevenção começa na mesa*. Pandorga: São Paulo, 2015.
- <sup>5</sup> Segura-Campos, M. R.; Ciau-Solins, N.; Rosado-Rubio, G.; Chel-Guerreo, L.; Betancur-Anacona, D. Chemical and Functional Properties of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Gum. *International Journal of Food Science* **2014**, 2014. 1. [CrossRef]
- <sup>6</sup> Ixtaina, V. Y.; Martinez, M. L.; Spotorno, V.; Mateo, C. M.; Maestri, D. M.; Diehl, B. W. K.; Nolasco, S. M.; Tomas, M. C. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, 24, 166. [CrossRef]
- <sup>7</sup> Bolaños, D.; Marchevsky, E. J.; Camiña, J. M. Elemental Analysis of Amaranth, Chia, Sesame, Linen, and Quinoa Seeds by ICP-OES: Assessment of Classification by Chemometrics. *Food Analytical Methods* **2016**, 9, 477. [CrossRef]
- <sup>8</sup> Busilacchi, H.; Quiroga, M.; Bueno, M.; Di Sapio, O.; Flores, V.; Severin, C. Evaluación de *Salvia hispanica* L. cultivada en el sur de Santa Fe (República Argentina). *Cultivos Tropicales* **2013**, 34, 55.
- <sup>9</sup> Mourão, W.; Leonardo, J.; Baptistella, C. Chia's cultivation in Brazil: future and perspectives. *Journal of Agronomic Sciences* **2014**, 3, 161.

- <sup>10</sup> Brito, A. L. B.; Oliveira, A. F.; Nogueira, A. R. A.; Pessoa, A. G. G.; Pontes, L. F. B. L. Determination of inorganic constituents and physicochemical characterization of functional flour samples. *Microchemical Journal* **2017**, *132*, 112. [CrossRef]
- <sup>11</sup> Rubio, C.; Gonzalez-Wellera, D.; Caballero, J. M.; Romano, A. R.; Paz, S.; Hardisson, A.; Gutierrez, A. J.; Revert, C. Metals in food products with rising consumption (brewer's yeast, wheat bran, oat bran, sesame seeds, flaxseeds, chia seed). A nutritional and toxicological evaluation. *Journal of Functional Foods* **2018**, *48*, 558. [CrossRef]
- <sup>12</sup> Silva, C. R.; Anunciação, P. C.; Matyelka, J. C. S.; Lucia, C. M. D.; Martino, H. S. D.; Pinheiro-Sant'ana, H. M. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chemistry* **2017**, *221*, 1709. [CrossRef]
- <sup>13</sup> Baker, S. A.; Miller-Ihli, N. J.; Fodor, P.; Woller, A.; *Atomic Spectroscopy in Food Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons: New York, 2012.
- <sup>14</sup> Brandão, G. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Bahia, Brasil, 2010.
- <sup>15</sup> 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]
- <sup>16</sup> Tadeo, J. L.; Sanchez-Brunete, C.; Albero, B.; Garcia-Valcarcel, A.I. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 2415. [CrossRef]
- <sup>17</sup> Bendicho, C.; Lavilla, I.; *Ultrasound-Assisted Metal Extractions. Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier: Whaltham, 2013. [CrossRef].
- <sup>18</sup> Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M. D. Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2007**, *70*, 299. [CrossRef]
- <sup>19</sup> Picó, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *42*, 84. [CrossRef]
- <sup>20</sup> Filgueiras, A. V.; Capelo, J. L.; Lavilla, I.; Bendicho, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion of determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* **2000**, *53*, 433. [PubMed]
- <sup>21</sup> Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A. A.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.; Albert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products: mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrasonics Sonochemistry* **2017**, *34*, 540 [CrossRef]
- <sup>22</sup> Novaes, C. G.; Yamaki, R. T.; Paula, V. F. de; Nascimento Júnior, B. B. do; Barreto, J. A.; Valasques, J. S.; Bezerra, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. *Revista Virtual de Química* **2017**, *9*, 1184. [CrossRef]
- <sup>23</sup> Myers, R. H.; Montgomery, D. C.; Anderson-Cook, C. M. *Response Surface Methodology: process and product optimization using designed experiments*. Fourth edition. Wiley Series in Probability and Statistics. John Wiley & Sons: New York, 2016.
- <sup>24</sup> Korn, M. G. A.; Boa Morte, E. S.; Santos, D. C. M. B. dos; Castro, J.T.; Barbosa, J.T.P.; Teixeira, A.P.; Fernandes, A.P.; Welz, B.; Santos, W.P.C. dos; Santos, E.B.G.N. dos; Korn, M. Sample preparation for determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – a review. *Applied Spectroscopy Reviews* **2008**, *43*, 67 [CrossRef]
- <sup>25</sup> Moraes, P. M.; Loureiro, V. R.; Padilha, P. M. Determinação de fosforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. *Química Nova* **2009**, *32*, 923 [CrossRef]
- <sup>26</sup> Araújo, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of*

- Chromatography B* **2009**, *877*, 2224. [CrossRef]
- <sup>27</sup> Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, *27*, 771. [CrossRef]
- <sup>28</sup> Stöckl, D.; Hondt, H. D.; Thiepont, L. M. Method validation across the disciplines – critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *Journal of Chromatography B* **2010**, *877*, 2180. [CrossRef]
- <sup>29</sup> MINITAB, Minitab Incorporation, Version 16.2.2, USA, 2010.
- <sup>30</sup> ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução nº 166 de 24 de julho de 2017. Critérios para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da união, n. 141, 25 julho de 2017.
- <sup>31</sup> INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008, julho de 2018. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos.
- <sup>32</sup> AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for standard method performance requirements, 2012.
- <sup>33</sup> NATA. National Association of Testing Authorities. Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Australia, 2018.
- <sup>34</sup> Wernimont, G. T. *Use of statics to develop and evaluate analytical methods*. 1. ed. Virginia: AOAC International, 1985.
- <sup>35</sup> Miller, J. N.; Miller, J. M. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 5.ed. Madrid: Editorial Prentice Hall, 2002.
- <sup>36</sup> Nascentes, C.; Korn, M.; Arruda, M. A. Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* **2012**, *69*, 37. [CrossRef]
- <sup>37</sup> Machado, I.; Bergmann, G.; Pistón, M. Short communication A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (F AAS). *Food Chemistry* **2016**, *194*, 373. [CrossRef]
- <sup>38</sup> De La Calle, I. N. C.; Lavilla, I.; Bendicho, C. Ultrasound-assisted single extraction tests for rapid assessment of metal extractability from soils by TXRF. *Journal of Hazardous Materials* **2013**, *260*, 202. [CrossRef]
- <sup>39</sup> de Paula, C. E. R.; Caldas, L. F. S.; Brum, D. M.; Cassella, R. J. Development of a focused ultrasound-assisted extraction method for the determination of trace concentration of Cr and Mn in pharmaceutical formulations by ETAAS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, *74*, 284. [CrossRef]
- <sup>40</sup> Peronico, V. C. D.; Raposo, J. L. Ultrasound-assisted extraction for the determination of Cu, Mn, Ca and Mg in alternative oilseed crops using flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* **2016**, *196*, 1287. [CrossRef]
- <sup>41</sup> Araujo, R. G. O.; Dias, F. S.; Macedo, S. M.; Santos, W. N. L.; Ferreira, S. L. C. Method development for the determination of manganese in wheat flour by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 397. [CrossRef]
- <sup>42</sup> Priego-Capote, F.; Castro, M. D. L. Dynamic ultrasound-assisted leaching of essential macro and micronutrient metal elements from animal feeds prior to flame atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 1376. [CrossRef]
- <sup>43</sup> Nascentes, C. C.; Arruda, M. A. Z.; Nogueira, A. R. A.; Nobrega, J. A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* **2004**, *64*, 912. [CrossRef]
- <sup>44</sup> Ferreira, B. L.; Chaves, E. S.; Vialich, J.; Sauer, E. Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó Ultrasound-assisted extraction from chocolate powder samples for the. *Brazilian Journal of Food Technology* **2014**, *17*, 236. [CrossRef]
- <sup>45</sup> Mosha, T. C.; Gaga, H. E.; Pace, R. D.; Laswai, H. S.; Mtebe, K. Effect of blanching on the content of antinutritional factors in selected vegetables. *Plants Foods for Human Nutrition*

1995, 47, 361. [CrossRef]

<sup>46</sup> Hurrell, R. F. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *The Journal of Nutrition* **2003**, 133, 2973S. [CrossRef]

<sup>47</sup> Denddougui, F.; Schwedt, G. In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food sample. *European Food Research and Technology* **2004**, 219, 409. [CrossRef]

<sup>48</sup> 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. F AAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry* **2009**, 113, 679. [CrossRef]

<sup>49</sup> Raes, K; Knockaert, D.; Struijs, K; Van Camp J. Role of processing on bioaccessibility of

minerals: Influence of localization of minerals and antinutritional factors in the plant. *Trends in Food Science & Technology* **2014**, 37, 32. [CrossRef]

<sup>50</sup> Quirrenbach, H. R. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2009**, 29, 24. [CrossRef]

<sup>51</sup> Freire, C. A. L.; Charnet, E. M. R.; Bonvino, H.; Charnet, R.; *Análise de modelos de regressão linear*. Unicamp: Campinas, 1999.

<sup>52</sup> Barros, J. M.; Bezerra, M. A.; Valasques, G. S.; Nascimento Júnior, B. B.; Souza, A. S.; Aragão, N. M. Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction procedure for Cu, Mn, Ni and Zn determination in ration to chickens. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2013**, 85, 891. [CrossRef]