

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

Rayane Cristina Vieira Costa

Preparo de amostras de ração para cães em sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para análise por HR-CS FAAS

**ARARAQUARA
2022**

RAYANE CRISTINA VIEIRA COSTA

Preparo de amostras de ração para cães em sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para análise por HR-CS FAAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação (PPG) do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

**ARARAQUARA
2022**

C837p

Costa, Rayane Cristina Vieira

Preparo de amostras de ração para cães em sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para análise por HR-CS FAAS / Rayane Cristina Vieira Costa. -- Araraquara, 2022
66 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara

Orientador: José Anchieta Gomes Neto

1. Método de decomposição. 2. Espectroscopia de absorção atômica. 3. Animais domésticos Alimentação e rações. 4. Microondas. 5. Preparo de amostras (Química). I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

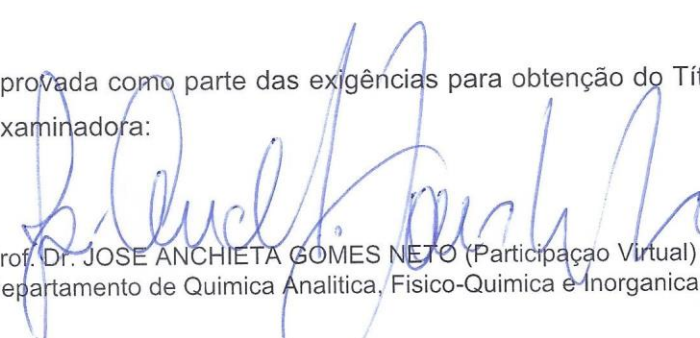
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Preparo de amostras de ração para cães em sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para análise por HR-CS FAAS."

AUTORA: RAYANE CRISTINA VIEIRA COSTA

ORIENTADOR: JOSE ANCHIETA GOMES NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Química, pela Comissão Examinadora:

A large, stylized blue ink signature of Prof. Dr. Jose Anchieta Gomes Neto is written over the text.
Prof. Dr. JOSE ANCHIETA GOMES NETO (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PEDRO ORIVAL LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Exatas / Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - Alfenas

Prof. Dr. GIAN PAULO GIOVANNI FRESCHI (Participação Virtual)
Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - Alfenas

Araraquara, 16 de dezembro de 2022

Rayane Cristina Vieira Costa

1. Dados Pessoais

Data de nascimento: 10/09/1997

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Pratápolis- MG

Nome do pai: Reginaldo Silva Costa

Nome da mãe: Roseli Vieira dos Reis Costa

2. Formação acadêmica

Graduação: Bacharelado em Química.

Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, Alfenas- MG.

Orientadora: Cristiana Schmidt de Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Período: 2015- 2020.

Mestrado: Química

Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - (IQ-CAr UNESP), Araraquara, SP.

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto.

3. Participação em eventos científicos.

COSTA, R. C. V.; MAGALHAES, C. S.; LUCCAS, P. O.; WISNIEWSKI, C. F. Construção de um biossensor potenciométrico em papel. XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Uberaba-MG. (Apresentação de trabalho/ Sessão coordenada).

COSTA, R. C. V.; MAGALHAES, C. S.; LUCCAS, P. O.; WISNIEWSKI, C. F. Construção de um biossensor potenciométrico em papel. V Simpósio Integrado Unifal- MG, 2019, Alfenas- MG. (Apresentação de trabalho/ Sessão coordenada).

42º Reunião anual da sociedade brasileira de química, 2019, Joinville-SC.
(Participante).

XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2018, Juiz de Fora- MG. (Participante/Congresso).

Semana nacional de ciência e tecnologia, realizado na Universidade Federal de Alfenas, 2017. (Participante).

6ª Semana da Química, realizado na Universidade Federal de Alfenas, 2016.
(Participante).

Semana de ciência e tecnologia, realizado na Universidade Federal de Alfenas, 2015. (Participante).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Reginaldo e Roseli, aos meus avós José Vicente e Maria Luiza, ao meu padrinho José Régis e ao meu namorado Wladimir, pelo apoio do início ao fim para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar e abençoar toda a minha trajetória de vida. Sem ele no meu caminho nada disso seria possível.

Aos meus pais, Roseli e Reginaldo, por todo esforço e dedicação para que eu tivesse a oportunidade de ter uma boa formação pessoal e profissional.

Aos meus avós, pelo carinho, incentivo, cuidado e por estarem presente durante todo o meu percurso.

Aos meus irmãos, amigos e todos os familiares que de alguma forma contribuíram para que eu alcançasse meu objetivo. Em especial ao meu padrinho, José Régis e ao meu namorado Wladimir Badaró, pelos conselhos, apoio, companheirismo e força.

Ao Prof. Dr. José Anchieta pela oportunidade, apoio, orientação, compreensão e paciência.

Aos integrantes do Grupo de Espectroanalítica e Automação, João Victor, Leonardo, Maísa, Raiane e Evilim pela amizade e apoio.

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e seu Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço ao CNPq e CAPES pela bolsa concedida, indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos!

EPÍGRAFE

*“Que os vossos esforços
desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes
coisas do homem foram
conquistadas do que parecia
impossível.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Atualmente, com o crescimento da população de animais de estimação e do mercado pet, o desenvolvimento do setor de alimentos se torna de grande interesse. Um dos alimentos mais consumidos são as rações. A alimentação está ligada diretamente com a nutrição e saúde desses animais, logo, as análises químicas das rações são essenciais. Considerando-se a simplicidade e baixo custo de manutenção e instrumentação, o CHDS (sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado) foi avaliado para a digestão de amostras de ração para cães para a determinação de macronutrientes (Na e K) e micronutrientes (Fe, Cu, Zn e Mn) por HR-CS FAAS (espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução e fonte contínua). A otimização do método foi realizada a partir de um planejamento fatorial com cinco variáveis e dois níveis. Uma das amostras de ração para cachorro foi digerida em CHDS em todas as condições do planejamento fatorial e em seguida foi realizado as medidas de teor de carbono residual (RCC) em todos os digeridos. A partir das medidas das concentrações de RCC determinaram-se as variáveis significativas. E levando em conta os resultados do planejamento fatorial, foi feito um estudo do efeito das massas e efeito da concentração de HNO_3 nas digestões em CHDS em amostras de material de referência certificado (CRM). Com o método otimizado, as amostras de rações para cães foram digeridas no CHDS e micro-ondas (MW-AD) para fins comparativos. Os testes estatísticos t e F foram calculados para todas as digestões em CHDS e MW-AD e a maioria dos resultados dois sistemas de digestão foram concordantes ao nível de 95% de confiança. As recuperações foram avaliadas com CRMs e apresentaram de modo geral recuperações entre 77,4 e 103%. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados e apresentaram valores semelhantes nos dois sistemas de digestões. Com base nos resultados, o CHDS pode ser utilizado para o preparo de amostras de rações para cachorro para determinação de macronutrientes e micronutrientes de forma efetiva.

Palavra-chave: Ração para cachorro. Preparo de amostras. CHDS. HR-CS FAAS.

ABSTRACT

Currently with the growing pet population and pet market, the development of the food sector becomes of great interest. One of the most consumed foods is dog food. The feeding is directly linked to the nutrition and health of these animals, so chemical analysis of the feed is essential. Considering the simplicity and low cost of maintenance and instrumentation, CHDS (conductively heated digestion system) was evaluated for the digestion of dog food samples for the determination of macronutrients (Na and K) and micronutrients (Fe, Cu, Zn and Mn) by HR-CS FAAS. The optimization of the method was carried out from a factorial design with five variables and two levels. One of the dogs food samples was digested in CHDS under all conditions of the factorial design and then residual carbon content (RCC) was measured in all digests. From the measurements of RCC concentrations the significant variables were determined and taking into account the results of the factorial design, a study was made of the effect of the masses and the effect of the concentration of HNO_3 in the digestions in CHDS in samples of certified reference material (CRM). With the optimized method, dog food samples were digested in CHDS and microwave (MW-AD) for comparative purposes. The t and F statistical tests were calculated for all digestions in CHDS and MW-AD and most of the results of the two digestion systems were in agreement at the 95% confidence level. The recoveries were evaluated with CRMs and generally showed recoveries between 77.4 and 103%. The detection and quantification limits were determined and presented similar values in the two digestion systems. Based on the results, CHDS can be used for the preparation of dog food samples for the determination of macronutrients and micronutrients effectively.

KEYWORDS: Dog food. Sample preparation. CHDS. HR-CS FAAS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros instrumentais do HR-CS FAAS utilizados para determinação de macro e micronutrientes nas amostras.....	44
Tabela 2: Planejamento fatorial com cinco variáveis e dois níveis.....	46
Tabela 3: Planejamento fatorial com cinco variáveis, dois níveis e seus valores codificados e reais.....	47
Tabela 4: Programa de aquecimento do experimento 1 para digestão das amostras em CHDS.	47
Tabela 5: Programa de aquecimento para digestão das amostras em CHDS.	49
Tabela 6: Programa de aquecimento para digestão das amostras em MW.....	50
Tabela 7: Teores de umidade das amostras de ração (para cães).	51
Tabela 8: Teor de carbono residual nos digeridos da amostra utilizando o CHDS.	53
Tabela 9: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na (mg.kg ⁻¹) em material de referência certificado de ração para peixe digerido com CHDS em diferentes concentrações de HNO ₃	57
Tabela 10: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na (mg.kg ⁻¹) em material de referência certificado de ração para peixe digerido com CHDS em diferentes massas.	57
Tabela 11: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) da determinação (mg.Kg ⁻¹) de Na, K, Cu, Fe, Mn e Zn por HR-CS FAAS em ração para cães digeridas em CHDS e MW-AD.....	58
Tabela 12: Resultados do teste f com 95% de confiança.....	59
Tabela 13: Resultados do teste t com 95% de confiança.....	59

Tabela 14: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) da determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na (mg.kg^{-1}) em materiais de referência certificados de ração para peixes, fígado bovino e tecido de mexilhão digerido por CHDS. 61

Tabela 15: Limites de detecção e quantificação obtidos por CHDS e MW-AD. 62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: População de animais no Brasil.	20
Figura 2: Esquema do faturamento do mercado mundial em 2020.	21
Figura 3: Esquema do faturamento da indústria pet do Brasil em 2020.	21
Figura 4: Sistema “cold finger”.	26
Figura 5: Aquecimento via radiação de MW.	27
Figura 6: Primeira versão do CHDS com frascos de borossilicato.	29
Figura 7: Frasco de borossilicato utilizado na digestão em CHDS.	29
Figura 8: Segunda versão do CHDS com frascos de quartzo.	30
Figura 9: CHDS com anteparo de acrílico.	32
Figura 10: Sistema de alívio de pressão. (a) Introdução da ferramenta para abertura da válvula; (b) Abertura da válvula; (c) Alívio de pressão.	32
Figura 11: Diagrama de uma lâmpada de cátodo oco.	36
Figura 12: Monocromador de rede (Czerny-Turner).	37
Figura 13: Esquema funcionamento de um FAAS.	37
Figura 14: Ilustração esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) com ênfase nos seus principais componentes.	39
Figura 15: Tradicional sinal transiente (absorbância versus o tempo).	40
Figura 16: Sinal de absorbância integrada versus comprimento de onda.	40
Figura 17: Imagem tridimensional (absorbância como função do tempo e do comprimento de onda).	41

Figura 18: CHDS.	43
Figura 19: Forno micro-ondas Anton Paar, modelo Multiwave.	43
Figura 20: Espectrômetro Analytik Jena contrAA 300.	44
Figura 21: Amostras de ração para cachorro maceradas e secas.	45
Figura 22: Estufa.	45
Figura 23: TOC-L CSH/CSN, Shimadzu.	48
Figura 24: Curvas analíticas para os elementos a) Cu, b) Fe, c) Mn, d) Zn, e) K e f) Na obtidas por HR-CS FAAS com absorbância integrada a 3 pixels.	52
Figura 25: Gráfico de parento da influência de cada variável nas digestões. ..	54
Figura 26: Gráfico de efeitos da concentração de HNO_3 e volume de H_2O_2 nas medidas de RCC.	55
Figura 27: Solução das amostras de ração para cachorro (1 ao 6) antes e após digestão.....	60
Figura 28: Solução das amostras de ração para cachorro (7 ao 10) antes e após digestão.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. Ração canina.	20
2.2. Preparo de amostras	24
2.2.1. Digestão de amostras por via úmida: sistemas abertos e fechados.....	25
2.2.2. Digestão assistida por radiação micro-ondas.	26
2.2.3. Sistema de decomposição com aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS).....	28
2.3. Espectrometria de absorção atômica (AAS).....	33
2.3.1. Histórico.....	33
2.3.2. Princípios fundamentais e funcionamento.	34
2.4. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua (HR-CS AAS).....	38
3. OBJETIVO	42
4. METODOLOGIA	42
4.1. Amostras, reagente e soluções analíticas.....	42
4.2. Instrumentação.	43
4.3. Preparo das amostras.....	45
4.4. Otimização do método de digestão em CHDS.....	46
4.4.1. Efeito do HNO ₃ , H ₂ O ₂ , temperatura, tempo de patamar e temperatura de pré-digestão	46
4.4.2. Medida do teor de carbono residual na amostra.....	48
4.4.3. Efeito das concentrações de HNO ₃ nas digestões.....	49
4.4.4. Efeito das massas nas digestões.	49
4.5. Digestão em CHDS.....	50

4.6. Digestão em MW.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1. Teor de umidade.....	51
5.2. Curvas de calibração.....	51
5.3. Otimização do método de digestão em CHDS.....	52
5.3.1. Planejamento fatorial.....	53
5.3.2. Teor de carbono residual.....	55
5.3.3. Efeito da concentração de HNO ₃	56
5.3.4. Efeito das massas.....	57
5.4. Determinação de macronutrientes e micronutrientes por HR-CS AAS...58	
5.5. Análise de materiais de referência certificados.....	61
5.6. Limite de quantificação.....	61
6. CONCLUSÃO	63
7. Referências.....	64

1. INTRODUÇÃO

Em 2021, foi realizado um estudo pela Abinpet sobre a população de animais domésticos no Brasil. O estudo revela que de 144,3 milhões animais de estimação, cerca de 55,9 milhões representa os cães, ou seja, 38,7% da população total de animais, portanto, são preferencialmente escolhidos pelos brasileiros. De acordo com a Abinpet, a população de cães cresceu cerca de 1,5% de 2019 a 2020. (ABINPET, 2021).

Nos últimos anos, o mercado pet se expandiu com o crescimento da população desses animais de estimação, principalmente no segmento de pet food (alimentação dos animais) que representou 75% do faturamento do mercado pet do Brasil em 2020 (ABINPET, 2021).

Há uma variedade extensa de alimentos para os cães, dentre eles as rações, que são frequentemente mais consumidos. Atualmente o mercado oferece diversas opções de rações que atendem as necessidades nutricionais de cada animal. Além disso, são práticas e de fácil acesso, que pode ser encontrada tanto em lojas pets quanto em supermercados. Considerando-se o crescimento do mercado de alimentos pets e as vantagens do consumo de rações, o interesse em estudos e pesquisas voltadas para esse seguimento torna-se cada vez mais promissor (SANTOS, 2017).

A composição da ração é extremamente importante para a qualidade de vida dos animais. Uma das componentes essenciais das rações são os minerais, eles podem ser classificados como macrominerais (Na e K) e microminerais (Fe, Cu, Zn e Mn). As quantidades dos macrominerais e microminerais influenciam diretamente na saúde e nutrição, visto que em maiores proporções pode ser prejudicial ao animal, portanto, as determinações das concentrações dos mesmos são necessárias (CELIK, OEHLenschLAGER, 2007).

As análises elementares por técnicas espectrométricas geralmente requerem a conversão prévia das amostras em solução. As mais comuns formas para tal conversão são decomposições por via seca (com forno tipo mufla) e decomposição por via úmida, que pode ser classificado em decomposição por via em frasco aberto e em frasco fechado (KRUG, 2010).

A decomposição (digestão) de amostras por via úmida em sistemas fechados caracteriza-se pela eficiência frente a uma variedade de matrizes, e devido aos

problemas relacionados às perdas de elementos voláteis em sistemas abertos, são preferencialmente utilizados (KRUG, 2010; MESTER et al., 2003).

Na determinação de análise elementar, a digestão assistida por radiação micro-ondas é uma das melhores alternativas para a decomposição de amostras e habilitam a empregar diversas técnicas espectroscópicas. Entretanto, o forno de micro-ondas possui alto custo de aquisição e manutenção, com isso, esses equipamentos podem restringir as suas utilizações por empresas de pequeno ou médio porte (RICHTER et al., 2001).

Um novo sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS) foi desenvolvido com o objetivo de digerir amostras visando a eficiência e baixo custo. Esse sistema foi avaliado e validado em análises elementares de amostras de plantas (MIRANDA et al., 2014; MIRANDA et al., 2014), carnes (VIEIRA, 2016), farinhas, chocolate em pó, leite em pó e café solúvel (MIRANDA et al., 2016). Os trabalhos realizados apresentaram excelentes resultados e demonstraram ser promissores.

O CHDS apresenta uma série de vantagens como baixo custo, simplicidade dos digestores clássicos, digestão em menor tempo comparado com sistemas abertos e uma facilidade de manutenção, pois o equipamento é desenvolvido com componentes que são facilmente encontrados no mercado nacional. Outra vantagem é que os componentes voláteis da amostra não são perdidos durante o aquecimento e a amostra não é contaminada pelo ambiente. Além disso, na literatura há poucos relatos sobre a tentativa de desenvolvimento e aplicações de (CHDS) (VIEIRA, 2016).

Considerando as vantagens desse sistema, é promissor expandir os estudos sobre o CHDS no desenvolvimento de métodos de análise de outras classes de amostras, como a de interesse do setor alimentício (rações para cães) empregando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Ração canina.

Nos últimos anos, têm-se observado, um aumento da população de animais criados para conviverem com os seres humanos, conhecidos como animais de estimação, tais como: cães, gatos, peixes, aves, répteis e outros pequenos mamíferos. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), a população de animais de estimação cresceu em média geral, 2,0% de 2019 a 2020, totalizando cerca de 144,3 milhões de animais de estimação no Brasil. Contudo, a preferência dos brasileiros é pelos cães que representa 38,7% da população total de animais de estimação e houve um crescimento de cerca de 1,5% de 2019 a 2020 (ABINPET, 2021).

Figura 1: População de animais no Brasil.



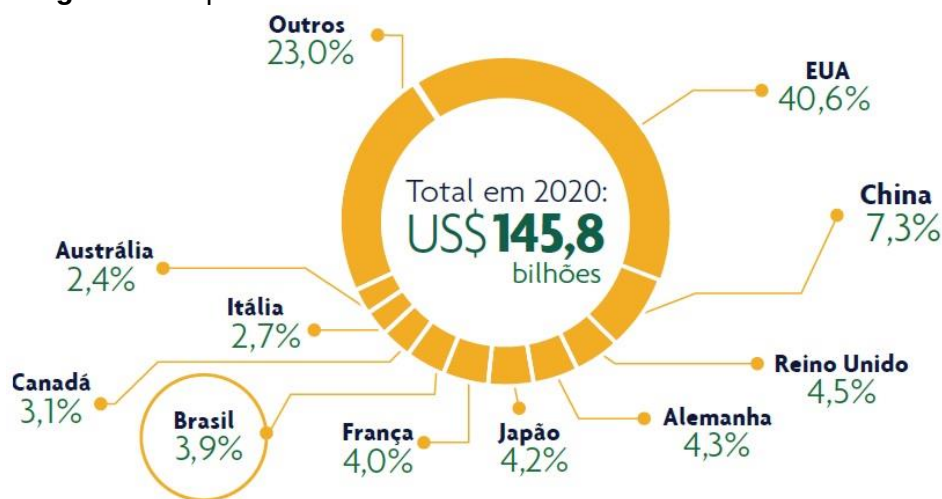
Crescimento acumulado 2019-2020	Cães 1,5%	Gatos 3,6%	Peixes 2,6%	Aves 1,0%	Répteis e Pequenos Mamíferos 4,2%	Média Geral 2,0%
---------------------------------------	--------------	---------------	----------------	--------------	--	------------------------

Fonte: Abinpet, 2021.

O mercado pet expandiu a produção de produtos destinados aos animais, no qual abrange os setores de saúde, alimentação, lazer, higiene e beleza, visando atender as necessidades do mesmo (MARICHALAR, 2006).

De acordo com a ABINPET, o mercado mundial de produtos pets faturou em 2020 US\$145,02 bilhões, sendo 3,9% do Brasil, que ocupa a 7ª colocação de maior faturamento do mundo (ABINPET, 2021).

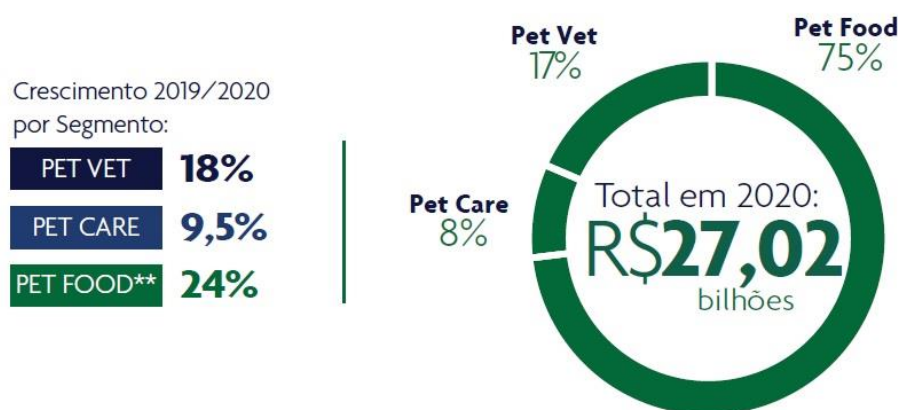
Figura 2: Esquema do faturamento do mercado mundial em 2020.



Fonte: Abinpet, 2021.

O mercado pet se divide em quatro segmentos, sendo o Pet Food (alimentação para animais domésticos), Pet Care (cuidados para o animal), Pet Vet (serviços veterinários), Pet Serv (outros tipos de serviços). No Brasil, o faturamento da indústria pet foi no total de R\$27,02 bilhões, sendo no total de 75% em setor de alimentos. Além disso, o setor de alimentos cresceu cerca 24% de 2019 a 2020, promovendo o grande interesse em pesquisas e estudos voltadas a esse setor (ABINPET,2021; BUSS et al., 2006).

Figura 3: Esquema do faturamento da indústria pet do Brasil em 2020.



Fonte: Abinpet, 2021.

A vida saudável dos cães está diretamente relacionada à nutrição, que se faz necessário uma boa alimentação. Atualmente, têm-se diferentes tipos de alimentos para cães, como as rações industrializadas, alimentos caseiros,

suplementos alimentares e petiscos, dentre eles as rações são as mais consumidas atualmente (SANTOS, 2017).

As rações oferecem diversos benefícios, como praticidade e fácil acesso, além de suprir as necessidades nutricionais e energéticas dos animais, promovendo a saúde, bem-estar, qualidade de vida e longevidade (SANTOS, 2017). Outra vantagem é a vasta diversidade de rações, que podem ser escolhidas de acordo com a raça, tamanho, idade e predisposição a doenças do animal, além das diversas opções de ingredientes em sua composição (ZICKER, 2008).

A dosagem adequada de legumes, carnes e vegetais podem influenciar na digestibilidade, palatabilidade, consistências de fezes, no comportamento e aparência do animal (MEEKER, 2006). Para melhor desempenho dos animais e ajudá-los a ter uma boa saúde, as rações são formuladas com quantidades específicas de nutrientes, sendo as principais, as fibras, carboidratos, proteínas, gorduras e minerais (ZICKER, 2008).

Dentre os nutrientes, os minerais se destacam apesar da pouca quantidade necessária, visto que, são essenciais para a manutenção dos processos metabólicos e fundamentais para o crescimento (AZEVEDO E CHASIN, 2003). Os minerais são classificados em macrominerais (Ca, P, Na, Cl, K, Mg e S) e microminerais (Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Se, Zn, Cr e F) (PINOW et al., 2021). A identificação de alguns macrominerais e microminerais são de extrema importância, considerando que são essenciais para a vida dos animais e em concentrações adequadas, pode contribuir para a prevenção de problemas na saúde (FRANÇA et al., 2011). Porém, alguns elementos são necessários a identificação em termos de concentração, pois os mesmos podem produzir efeitos tóxicos em altas concentrações (CELIK, OEHLENSCHLAGER, 2007).

O método de digestão no CHDS foi aplicado em amostras de rações de diferentes portes de cães e diferentes variedades de ingredientes, e as determinações de macronutrientes (Na e K) e micronutrientes (Fe, Cu, Zn e Mn) presentes nas amostras foram realizadas por meio da espectrometria de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua (HR-CS FAAS). Foram identificados os macronutrientes (Na e K) e micronutrientes (Fe, Cu, Zn e Mn) presentes nas amostras.

O ferro é um elemento muito nutritivo presente em vários alimentos, inclusive nas rações para cães. A absorção deste mineral influencia em alguns fatores, dentre eles a idade e a fonte dietética, e também participa no processo de transporte de oxigênio e dióxido de carbono necessários a respiração celular (SIQUEIRA et al., 2006). A concentração inadequada deste mineral no organismo pode afetar no crescimento, pode causar fraqueza e diarreia (PINOW, 2021).

O manganês é um dos metais essenciais, pois participa de várias funções biológicas, como no auxílio do crescimento, na reprodução, no metabolismo de carboidratos e lipídios, e na formação dos tecidos conjuntivos. (ULUOZLU et al, 2007). Também atua no desenvolvimento dos ossos, funcionamento dos músculos e tecido nervoso (PINOW, 2021).

O zinco está envolvido em muitos processos biológicos, como multiplicação celular, desenvolvimento dos órgãos sexuais do macho e em todas as fases do processo reprodutivo da fêmea. Estão envolvidos também na imunologia, saúde da pele e pelos. (FASCETTI E MORRIS, 2002). A deficiência desse micromineral reduz a síntese de DNA e RNA, ocasionando o impedimento na divisão e crescimento celular (PINOW, 2021).

O potássio também é um dos elementos essenciais. Sua excreção é por via urinária, seus íons são responsáveis por regular a pressão osmótica e a transmissão de impulsos nervosos (AZEVEDO E CHASIN, 2003). Além dessas funções, contribui na síntese de proteínas, transporte de oxigênio, metabolismo de carboidratos e manutenção dos tecidos cardíacos (PINOW, 2021).

O cobre é distribuído nos tecidos biológicos, auxilia na absorção e transporte do Fe e atua na síntese de colágeno e elastina. A deficiência desse elemento, pode ocorrer a falha na produção de colágeno, na pigmentação dos pelos, anemia, ossos frágeis, retardo no crescimento e diarreia (PINOW, 2021).

E o sódio, participa de processos biológicos, como no funcionamento do organismo, na manutenção de energia do corpo e nas contrações musculares (incluindo as do coração) (FASCETTI E MORRIS, 2002).

1.2. PREPARO DE AMOSTRAS

Atualmente a espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica largamente empregada para a determinação de elementos em diversas amostras. A técnica de HR CS FAAS necessita de um preparo da amostra que geralmente deve estar na forma de solução, conseqüentemente, faz-se necessário converter as amostras em uma solução homogênea. Os procedimentos utilizados para conversão das amostras são geralmente conhecidos como dissolução e decomposição (DANIEL et al., 2005).

A dissolução da amostra é realizada com uso de solvente sob baixas temperaturas, na qual provoca a transformação da amostra em uma solução. Porém, durante o processo a reação química pode ocorrer ou não, conseqüentemente, há o risco de a dissolução ser incompleta tornando o método menos eficiente e pouco utilizado (KRUG, et al. 2016).

A decomposição, também chamada de digestão, é uma alternativa de transformação da amostra em solução e apresenta maior eficiência. Ela pode ser realizada a via úmida ou a via seca (KRUG, et al. 2016).

A decomposição por via seca, a amostra é aquecida em forno mufla em altas temperaturas (400 e 550 °C) e sob pressão atmosférica, em seguida a amostra é dissolvida em ácido. A vantagem desse método é a simplicidade e a utilização de pequenos volumes de ácido. E a desvantagem é o alto risco de perda de compostos voláteis, contaminação e longo tempo de aquecimento (HOENIG; DE KERSABIEC, 1996).

O método de decomposição por via úmida, a amostra é aquecida em altas temperaturas em meio ácido. Os ácidos mais utilizados são o ácido nítrico (HNO_3), sulfúrico (H_2SO_4) e perclórico (HClO_4). A escolha dos ácidos depende da composição da amostra, concentração do analito e a técnica que será utilizada para análise. Além disso, podem ser utilizados sozinhos, com outros ácidos ou oxidantes como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FLORES et al., 2007; DE OLIVEIRA, 2003).

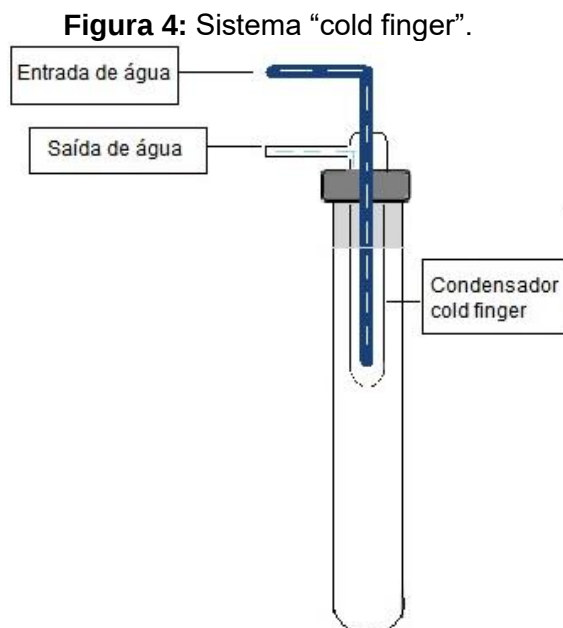
1.2.1. Digestão de amostras por via úmida: sistemas abertos e fechados

Os processos de digestões por via úmida são classificados como sistema aberto ou fechado. As formas de aquecimento podem ser realizadas por via ultrassônica, ultravioleta, condutiva e radiação por micro-ondas (FLORES et al., 2007; DE OLIVEIRA, 2003).

As digestões por via úmida em sistemas abertos, são geralmente utilizados um bloco ou chapa de aquecimento combinada com ácidos em pressão atmosférica. Essa técnica tem como vantagem a utilização de grandes massas de amostra e baixo custo de manutenção e aquisição dos equipamentos. Contudo, apresenta desvantagens, como perdas por volatilização, sujeito a contaminação e matrizes complexas podem não ser decompostas. Além disso, a digestão pode ser incompleta devido à temperatura de ebulição do ácido em pressão atmosférica, sendo necessário acrescentar outros ácidos (KRUG, et al., 2016; SKOOG, et al., 2008).

Em sistemas fechados, a quantidade de amostra utilizada é limitada, porém, a técnica apresenta menor perda por volatilização e menor contaminação comparada com sistemas abertos. Outra vantagem é a eficiência de digestão, pois o aquecimento do frasco fechado aumenta a pressão interna do sistema, consequentemente há um aumento do ponto de ebulição do ácido e mais alta decomposição da amostra. Além disso, considerando a alta temperatura e pressão interna do sistema, o tempo de digestão da amostra é menor e apresenta menor consumo ácido (ATKINS; JONES, 2012).

O sistema de digestão “cold finger” (Figura 4) é um sistema fechado que consiste no aquecimento por bloco digestor e opera em pressões atmosféricas. Ele foi desenvolvido com uma tampa e um aparato que permite a circulação de água e o resfriamento da temperatura. O sistema atua como um condensador de vapores ácidos, consequentemente permite a regeneração do ácido (VIEIRA, 2016).



Fonte: Autor, 2022.

A regeneração do ácido permite que a amostra continue digerindo, tornando a digestão ainda mais eficiente. Esse sistema tem a vantagem de utilizar quantidades maiores de amostra, é simples, de baixo custo de manutenção e aquisição e há menor perda por volatilização. Portanto, também apresenta desvantagens, tais como a utilização de baixas pressões e maior tempo de decomposição. Apesar disso, ainda sim a técnica pode ser uma boa alternativa para substituir sistemas mais aprimorados. (FERREIRA et al., 2013; VIEIRA, 2016).

Outro método de sistema fechado utilizado é o sistema de autoclave. O sistema consiste nas digestões em condições de altas pressões e apresenta também como vantagem o baixo custo, porém a desvantagem são os longos tempos de digestão comparado com outros sistemas de digestão, como por exemplo, o sistema de digestão por radiação de micro-ondas (NAVARRETE et al., 2010; LEHTIMAK et al. 2016).

1.2.2. Digestão assistida por radiação micro-ondas.

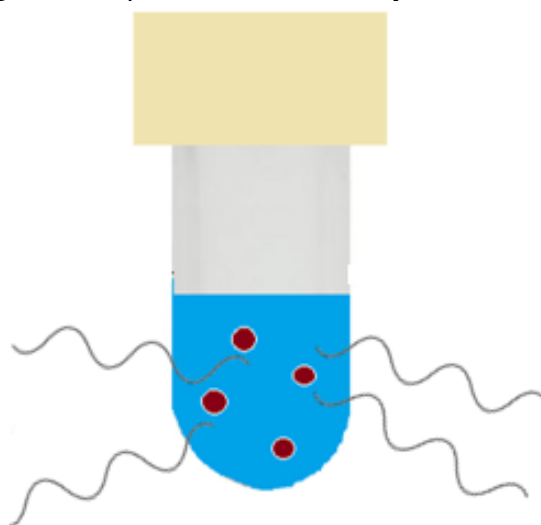
Na interação da radiação micro-ondas com a solução, os íons e as moléculas absorvem a energia provocando o mecanismo de rotação de dipolo e migração

iônica. Esses fenômenos resultam em um movimento das espécies da solução e consequentemente, o aumento na sua temperatura (KRUG, 2010).

A rotação de dipolo ocorre quando a presença de um campo elétrico provoca a orientação das moléculas polares na direção do campo, apresentando resistência e consequentemente a dissipação da energia na forma de calor. Além disso, com a remoção do campo, as moléculas retornam ao estado não alinhado e a energia também é liberada na forma de calor (ZLOTORZYNSKI, 1995).

A migração iônica ocorre quando um campo elétrico oscilante da radiação micro-ondas interage com as espécies iônicas, causando a movimentação dos íons. O deslocamento dos íons produz um fluxo de corrente que sofre resistência devido a outras espécies com o fluxo de íons oposto ao seu deslocamento, consequentemente, ocorre a dissipação de energia e um aumento na temperatura (ZLOTORZYNSKI, 1995; MICHAEL et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2011).

Figura 5: Aquecimento via radiação de MW.



Fonte: Autor, 2022.

A frequência da radiação micro-ondas do espectro eletromagnético pode variar de 0,3 a 300 GHz. A radiação de fornos de micro-ondas utilizados para uso doméstico e laboratórios, apresenta frequência de 2450 MHz. A potência, sendo gerada em um forno de radiação micro-ondas do tipo doméstico ou analítico, normalmente é superior a 600 W (KRUG, 2010).

Nos sistemas de digestão assistido por radiação micro-ondas, as micro-ondas aquecem diretamente a solução ácida, com isso, o aquecimento pode ser

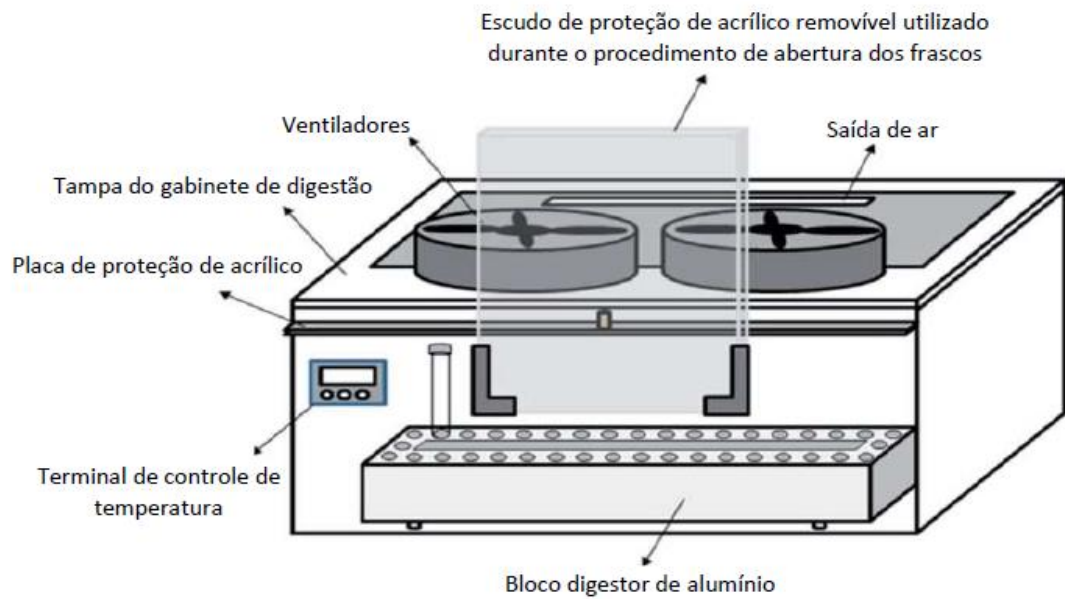
realizado em menor tempo em relação ao aquecimento condutivo (RICHTER et al., 2001). O sistema fechado impede a perda de elementos voláteis, tornando um dos melhores métodos a serem utilizados na decomposição (AGAZZI; PIROLA, 2000).

Outra vantagem do sistema é que permite a decomposição das amostras com segurança, robustez e possibilita a diluição dos ácidos utilizados na digestão, minimizando o uso de reagentes tóxicos. Porém, o equipamento emprega ferramentas eletrônicas aprimoradas que são responsáveis pelo alto custo do equipamento, assim, há o grande interesse no estudo de outros métodos de digestão, tais como, os sistemas com aquecimento condutivo que são de baixo custo de manutenção e instrumentação (VIEIRA, 2016; BENDICHO et al., 2012).

1.2.3. Sistema de decomposição com aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS).

Em 2014, Miranda, Pereira Filho e Gomes Neto (2014), desenvolveram um novo sistema de decomposição de amostras em frasco fechado visando o baixo custo, eficiência e menor tempo de digestão comparado com o sistema com aquecimento condutivo em frasco aberto. O CHDS foi desenvolvido com um gabinete de aço, um terminal de controle de temperatura e no seu interior, um bloco digestor de alumínio disposto de 38 orifícios para inserção dos frascos de digestão. Na tampa do gabinete há dois ventiladores que auxiliam na etapa de resfriamento dos frascos. Para uma maior segurança, durante a digestão é utilizado uma placa de proteção de acrílico abaixo da tampa do gabinete. Além disso, na parte frontal uma proteção de acrílico é inserida no centro a fim de proteger o analista durante a abertura dos frascos. A figura 6 apresenta o primeiro sistema de digestão. (MIRANDA, et al., 2014).

Figura 6: Primeira versão do CHDS com frascos de borossilicato.



Fonte: Miranda; Pereira Filho; Gomes Neto, 2014.

Os frascos de digestão utilizados eram de borossilicato. Para sua vedação havia um pino de teflon com anel de elastômero perfluorado e uma tampa de baquelite (Figura 7) (MIRANDA, et al., 2014).

Figura 7: Frasco de borossilicato utilizado na digestão em CHDS.

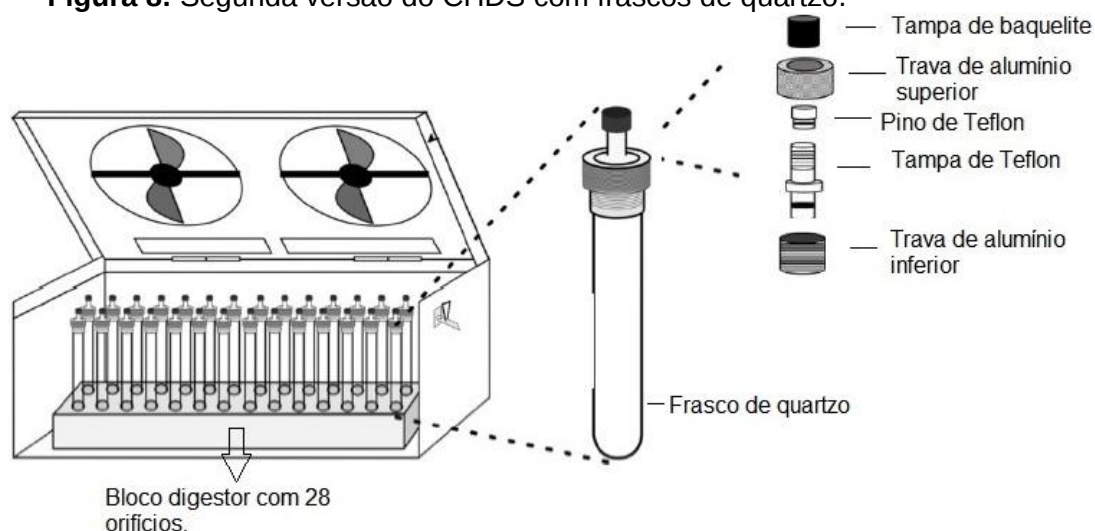


Fonte: Miranda; Pereira Filho; Gomes Neto, 2014.

Primeiramente esse sistema foi aplicado para digestão de amostras de plantas (espinafre, couve, chicória, arruda, almeirão, repolho branco e folhas de alface) para análise elementar de Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn por ICP-OES. Para fins comparativos, as amostras foram digeridas em um forno de micro-ondas. Além disso, os autores utilizaram materiais de referência certificados de folhas de maçã, pêssigo, tomate e agulhas de pinheiro para avaliação do desempenho do sistema. Os resultados obtidos com CHDS foram concordantes comparado com forno de micro-ondas. Porém, os resultados de limites de detecção para Al, B, Ca e Zn foram maiores para o CHDS devido a impurezas presente no vidro de borossilicato. (MIRANDA, et al., 2014).

Visto que os resultados de limites de detecção apresentaram valores superiores, os frascos de borossilicato utilizados no sistema de CHDS foram substituídos por frascos de quartzo com o objetivo de obter menores valores de limites de detecção. Os frascos de quartzo foram modificados com novas peças, sendo elas, uma tampa de Teflon e duas travas de alumínio, além disso, o pino de Teflon e a tampa de baquelite foram mantidos. Contudo, o sistema passou a obter 28 posições para inserção dos frascos no bloco digestor (Figura 8). (MIRANDA, et al., 2014).

Figura 8: Segunda versão do CHDS com frascos de quartzo.



Fonte: Adaptado de Miranda; Vieira; Gomes Neto, 2014; Miranda; Vieira; Gomes Neto, 2015.

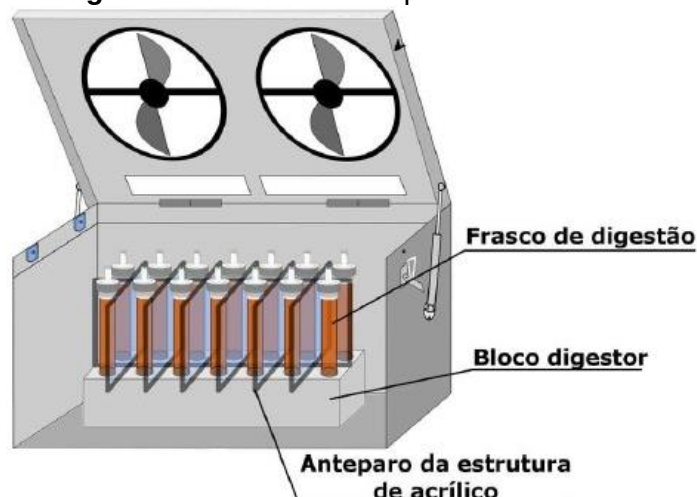
Neste trabalho desenvolvido por Miranda, Vieira e Gomes Neto (2014), amostras de cana-de-açúcar foram digeridas para análise elementar de Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn por ICP OES. As amostras de materiais de referência certificados utilizados foram de folha de maçã, folhas de repolho branco e agulhas de pinheiro. Para fins comparativos, as amostras foram digeridas em forno de micro-ondas e apresentaram resultados concordantes. As recuperações apresentaram bons resultados e os limites de detecção foram próximos aos resultados do forno de micro-ondas (MIRANDA, et al., 2014).

Em 2015, Miranda, Vieira e Gomes Neto (2015) aplicaram o sistema de CHDS em amostras de leite em pó, chocolate em pó e café solúvel, para análise elementar de Ca, K, Mg, Na, Zn, Fe, Cu e Mn por HR-CS FAAS e Cd, Mo e Se por ICP-MS/MS. Novamente os resultados obtidos foram promissores e o CHDS também se mostrou ser eficiente para as amostras de alimentos (MIRANDA, et al., 2015).

Apesar do CHDS apresentar excelentes resultados, durante a retirada da tampa de baquelite o sistema era manuseado sobre pressão, consequentemente, o analista necessitava de alguns cuidados ao realizar o alívio da pressão do frasco. Além disso, os frascos não eram isolados no interior do gabinete, consequentemente, uma eventual falha no aumento da pressão e estouro de um dos frascos, afetaria todos os demais. (VIEIRA, 2016).

Em 2016, com o objetivo de obter maior segurança do analista no manuseamento do CHDS, Vieira (2016) realizou modificações no bloco digestor. Os orifícios de inserção dos frascos foram isolados com anteparos de acrílico, reduzindo para 14 posições de inserção dos frascos. O anteparo possibilitou o isolamento individual de cada frasco para que não ocorra o comprometimento dos demais no caso de uma falha destrutiva de um dos frascos (Figura 9). (VIEIRA, 2016).

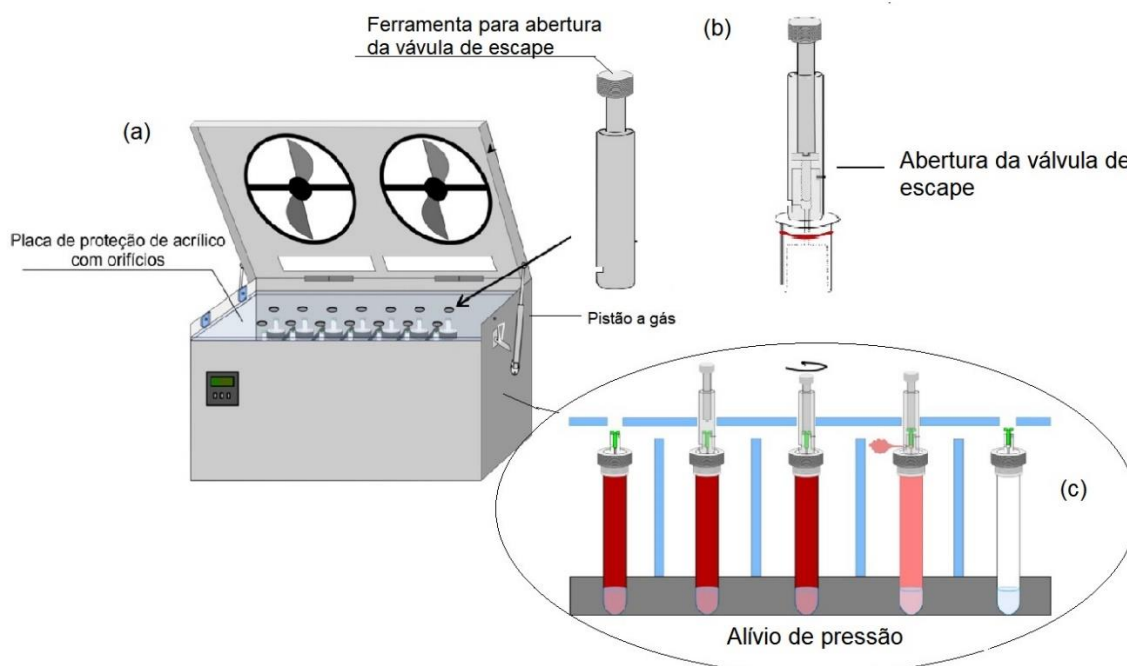
Figura 9: CHDS com anteparo de acrílico.



Fonte: Vieira, 2016.

Foi desenvolvido um sistema de alívio de pressão para abertura dos frascos, uma placa de proteção de acrílico com orifícios e uma tampa de Teflon foi aprimorada para a vedação do frasco de quartzo. Além disso, foi adaptado dois pistões a gás na tampa do gabinete para evitar o fechamento de forma brusca devido ao peso dos ventiladores e também facilitar no momento da abertura da tampa do gabinete (Figura 10) (VIEIRA, 2016).

Figura 10: Sistema de alívio de pressão. (a) Introdução da ferramenta para abertura da válvula; (b) Abertura da válvula; (c) Alívio de pressão.



Fonte: Adaptada de VIEIRA, 2016.

Neste trabalho, foram digeridas em CHDS amostras de músculo (bovino, suíno e frango), fígado (bovino, suíno e frango) e rim (bovino e suíno) para a determinação de Na, Ca, K, Mg, P, S, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn e contaminantes inorgânicos (As, Cd, e Pb) utilizando ICP OES e ICP-MS. Amostras de material de referência certificados de músculo bovino, fígado bovino e rim suíno foram digeridas para avaliação da exatidão. As recuperações apresentaram bons resultados, as análises elementares e os limites de detecção apresentaram valores próximos comparado com o forno de micro-ondas. (VIEIRA, 2016).

Com base nos resultados de todos os trabalhos realizados, conclui-se que o CHDS é uma boa alternativa, visto que apresenta baixo custo, eficiência, simplicidade e fácil manutenção. Contudo, prosseguir os estudos em CHDS para demais setores, como o setor pet pode ser interessante, pois o mercado pet está se ampliando cada vez mais.

1.3. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA (AAS).

1.3.1. Histórico.

Desde a idade antiga, os gregos já haviam criado modelos sobre a natureza da luz e visão humana. Porém, o primeiro conceito sobre a absorção da luz surgiu em 1802 por Willian Wollaston e Fraunhofer, eles observaram a existência de linhas escuras no espectro da luz solar, posteriormente, Fraunhofer descobriu que as linhas escuras indicavam que parte da energia da luz solar havia sido absorvida (WELZ; SPERLING, 1999).

Em 1860, o físico Gustav Kirchoff verificou o fenômeno de absorção e emissão, onde afirmou que os corpos podem absorver radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda e também podem emitir radiação desse mesmo comprimento de onda. Em 1900, Max Planck definiu que a absorção e emissão pode ocorrer somente quando um átomo recebe determinada radiação de comprimento de onda, ou seja, trocavam energia através de “quanta” (pacotes de energia) (WELZ; SPERLING, 1999).

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Equação 1

Onde, E é a energia; h , é a constante de Planck; ν , é a frequência; c , a velocidade da luz no vácuo; e λ , o comprimento de onda (ATKINS; JONES, 2012).

A energia da fonte de radiação eletromagnética incide no átomo gasoso em seu estado de menor energia, absorve um quantum de energia e passa de seu estado fundamental para o estado excitado, nível de maior energia. Após a absorção da energia, o átomo retorna ao seu estado fundamental liberando a energia adquirida nas formas de luz ou calor. Além disso, a quantidade de radiação absorvida está diretamente relacionada com a concentração de átomos no estado fundamental (WELZ; SPERLING, 1999).

Em 1955, o conceito do método de espectrometria de absorção atômica (AAS) foi proposto por Alan Walsh, além disso, foi o primeiro a criar o modelo de um espectrômetro de absorção atômica. A princípio os espectrômetros de absorção atômica eram compostos por uma fonte de radiação, a lâmpada de catodo oco que emite uma série de linhas, um atomizador, forno de grafite ou chama, um seletor de comprimento de ondas, o monocromador, e uma válvula fotomultiplicadora para transformar a energia da radiação eletromagnética em sinal elétrico. Em 1979 foi desenvolvido por Harnly, um espectrômetro de absorção atômica para detecção simultânea, utilizando uma lâmpada de xenônio como fonte de radiação contínua e como atomizador o forno de grafite ou chama (WELZ; SPERLING, 1999; WELZ et al., 2014).

1.3.2. Princípios fundamentais e funcionamento.

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica utilizada para determinação e quantificação elementos de diversas amostras sólidas, líquidas ou gasosas. O espectrômetro de absorção atômica é composto por uma fonte de radiação, atomizador, monocromador, detector e processador.

A técnica se baseia na absorção da radiação de comprimento de onda definido (proveniente da fonte de radiação) dos átomos gasosos no estado fundamental gerados pelo atomizador. Consequentemente, o comprimento de

onda selecionado pelo monocromador é então transferido pelo detector que transforma esta energia em sinal elétrico (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

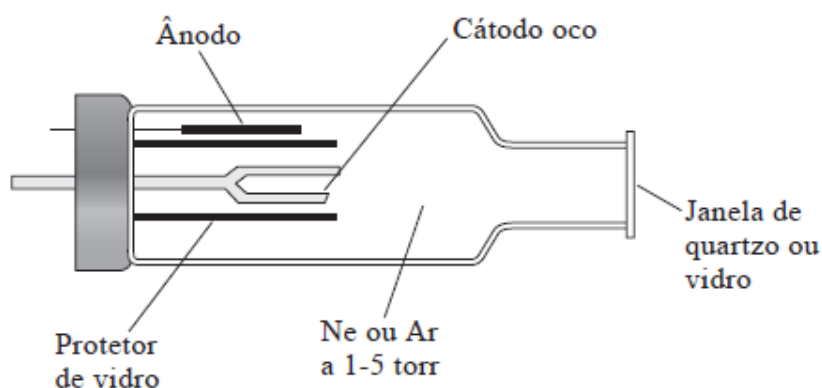
Em espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*), a solução da amostra é aspirada e nebulizada, formando gotículas dispersas em gás (aerossol) sendo misturada com um gás oxidante ou combustível, em uma câmara de nebulização. Em seguida, o aerossol é arrastado pelos gases e levado para a chama.

O atomizador em chama gera átomos livres, que absorvem a radiação de comprimento de onda emitida pela fonte de radiação, e, conseqüentemente, é determinado a concentração do elemento de interesse (Figura 13). (WELZ; SPERLING, 1999).

A mistura de gás combustível ar/acetileno ($\text{ar/C}_2\text{H}_2$) e óxido nitroso/acetileno ($\text{N}_2\text{O/C}_2\text{H}_2$), são os mais utilizados em FAAS, podendo atingir temperaturas de aproximadamente 2250 e 2850°C. A proporção dessa mistura de gás (oxidante/combustível) interfere diretamente na eficiência de atomização. A chama oxidante (vazão de ar maior que o oxidante) favorece a atomização em elementos com eficiência em atomizar pela formação de óxidos. E a chama redutora (vazão de combustível maior em relação ao oxidante) favorece a atomização de elementos com propensão a formar de óxidos refratários (FARRUKH, 2012; KRUG, et al., 2004).

A fonte de radiação tem a função de excitar o analito no seu estado fundamental. Em AAS, a fonte de radiação mais utilizada é a lâmpada de catodo oco (HCL- do inglês *Hallow Cathode Lamp*) (Figura 11). As lâmpadas de catodo oco são constituídas por um tubo de vidro composto por um anodo de tungstênio, um catodo cilíndrico e um gás inerte. O catodo é produzido com o metal característico do analito (WELZ; SPERLING, 1999).

Figura 11: Diagrama de uma lâmpada de cátodo oco.

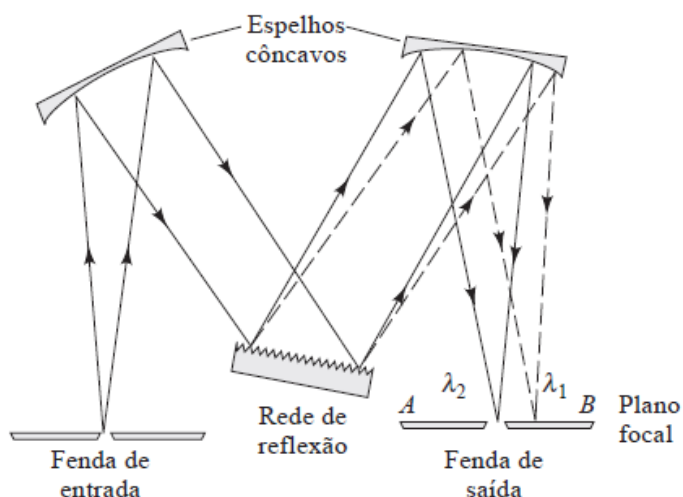


Fonte: SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002.

Uma diferença potencial é aplicada entre os eletrodos, capaz de produzir a ionização do gás inerte, consequentemente, os cátions do gás colidem no cátodo e liberam átomos do metal que produzem uma nuvem atômica. Uma parte dos átomos removidos do cátodo, absorvem energia necessária para promover a excitação. O átomo ao retornar ao seu estado fundamental, emite uma radiação de comprimento de onda característico ao analito. Existem lâmpadas de cátodo oco que contêm mais de um elemento, permitindo que forneçam linhas espectrais para diferentes amostras (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Para a separação das linhas espectrais de interesse e as linhas emitidas pela fonte de radiação, um monocromador é utilizado, localizado entre o atomizador e o detector. O monocromador é composto por um prisma ou rede de difração ligadas a duas fendas, a de entrada e de saída da radiação. Os monocromadores mais utilizados são do tipo Echelle e Czerny-Turner. O tipo Echelle é composto por um prisma e uma rede de difração, que separam o feixe de radiação em vários comprimentos de ondas e em diferentes ângulos. O Czerny-Turner é composto por uma rede de difração e espelhos esféricos, em que permite ajustar o ângulo de incidência e de reflexão (Figura 12). O espelho focaliza a radiação na rede de difração e separam os feixes de radiação de interesse. Em seguida, os feixes de radiação são dirigidos para outro espelho esférico e por fim para a fenda de saída (WELZ; SPERLING, 1999).

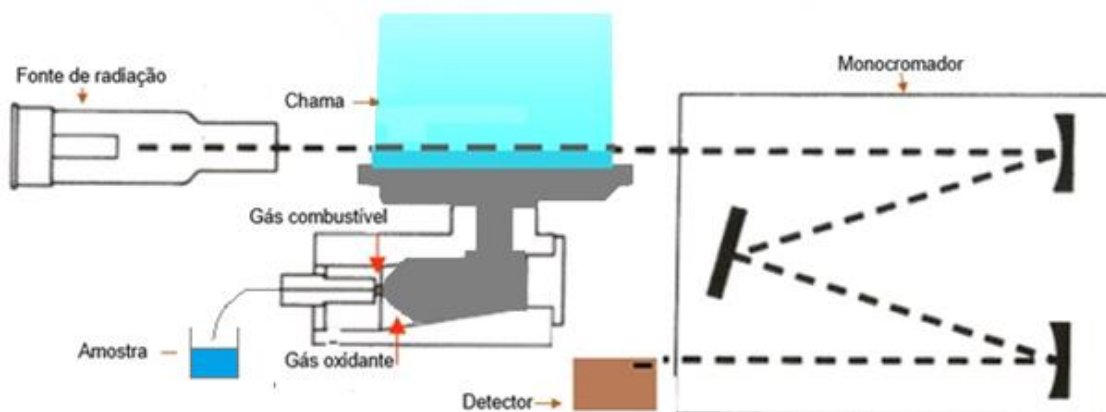
Figura 12: Monocromador de rede (Czerny-Turner).



Fonte: SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002.

Após a seleção das linhas espectrais de interesse pelo monocromador, as linhas são encaminhadas para o detector, que tem a função de transformar a energia recebida em um sinal elétrico. Os tipos de detectores empregados em AAS são as válvulas fotomultiplicadoras ou detectores de estado sólido (CCD, do inglês *coupled-charge device*). Atualmente os detectores podem ser utilizados em conjunto com um microcomputador, que permite registrar os sinais de absorbância ou concentrações (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002.; BORGES, 2009).

Figura 13: Esquema funcionamento de um FAAS.



Fonte: Adaptado (KRUG et al., 2021).

O mecanismo segue a Lei de Lambert- Beer, que afirma que a radiação absorvida é proporcional a concentração do analito, descrita na equação 2 (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = abc \quad \text{Equação 2}$$

Sendo, A , a absorvância; T a transmitância; I_0 a intensidade da radiação incidente no atomizador; I , a radiação não absorvida pelos átomos ou íons; a , a constante de absorvidade; b , o caminho óptico; e c a concentração do analito.

1.4. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua (HR-CS AAS).

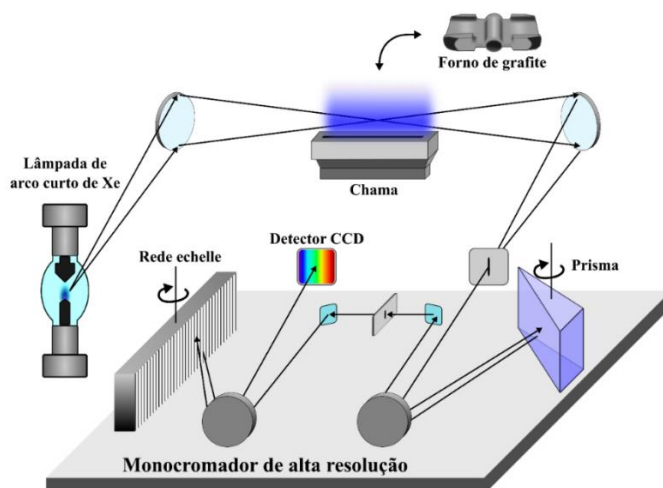
Desde o século XIX os espectroscópicos vêm sendo utilizados para a determinação de elementos traços em inúmeras amostras. Na espectrometria de absorção atômica (AAS) o atomizador gera átomos livres (estado gasoso) que absorvem a radiação com uma frequência específica, ocasionando a excitação dos átomos, e ao retornarem no seu estado fundamental emitem uma radiação espectral característica ao analito (HEITMANN et al., 1996.; WELZ et al., 2003.; GALLINDO et al., 2005).

Em 1996 Heitmann descreveu o primeiro equipamento de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), o instrumento contém uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão que opera em modo hot spot e a emissão se encontra na faixa de 190 e 850 nm. A lâmpada contém dois eletrodos de tungstênio e opera a 300 W de potência. O computador controla e corrige o posicionamento dos arcos movimentando o espelho e certificando que o feixe de radiação esteja incidindo na fenda de entrada do monocromador ((HEITMANN et al., 1996; WELZ et al., 2003).

Conforme a Figura 14 abaixo, a radiação incide em um prisma e em uma rede de difração, o prisma seleciona o espectro e o monocromador fornece a alta resolução do intervalo espectral de interesse. O espectrômetro apresentado na Figura 14, refere-se ao modelo DEMON (Double Echelle Monochromator), composto por um prisma Littrow e uma rede Echelle. O comprimento de onda é

selecionado pela rotação do prisma e da rede de difração para posições pré-ajustadas. Uma lâmpada de neônio localizada em frente à fenda intermediária, emite várias linhas estreitas que são atribuídas a um pixel correspondente no detector e esse sistema é utilizado para a estabilização (WELZ et al., 2005; HEITMANN et al., 1996; WELZ et al., 2003).

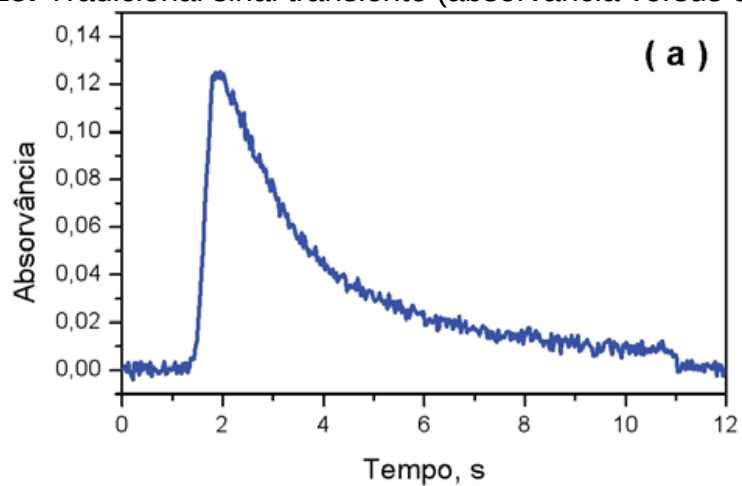
Figura 14: Ilustração esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) com ênfase nos seus principais componentes.



Fonte: (VIEIRA, 2020).

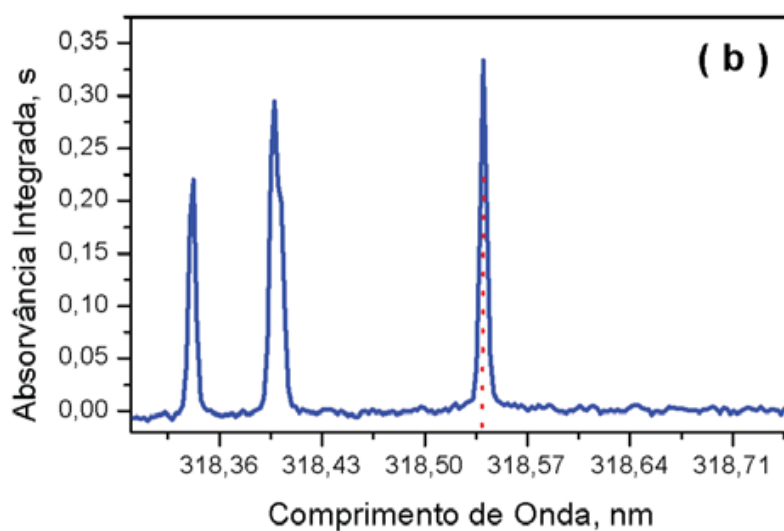
Após o processo de separação, a radiação emitida e transmitida atinge o detector que é formado por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD). Cada pixel contém um amplificador individual, com isso, o instrumento opera com 512 detectores independentes em que 200 são utilizados para fins analíticos (SILVA et al., 2005). Consequentemente, é possível avaliar três dimensões diferentes para visualizar os dados em HR-CS AAS, conforme as Figuras (15, 16 e 17) abaixo.

Figura 15: Tradicional sinal transiente (absorvância versus o tempo).



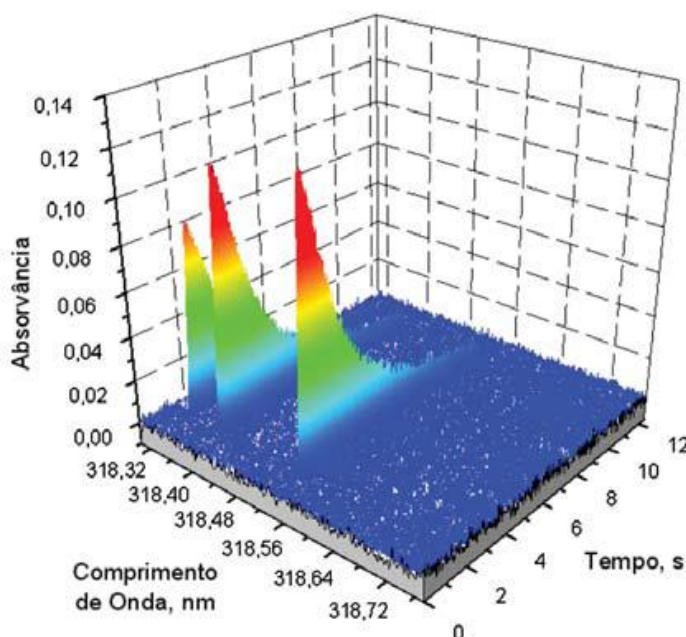
Fonte: (SILVA et al, 2005).

Figura 16: Sinal de absorvância integrada versus comprimento de onda.



Fonte: (SILVA et al, 2005).

Figura 17: Imagem tridimensional (absorvância como função do tempo e do comprimento de onda).



Fonte: (SILVA et al, 2005).

O sistema é controlado por um software que é capaz de corrigir eventos que afetam todos os pixels do detector, além disso, esta correção há alta intensidade de emissão da fonte contínua e auxilia no fato de não ser necessário a modulação de radiação. Todos os pixels são iluminados pela mesma fonte de radiação e lidos, porém apenas alguns são utilizados para medir a absorção atômica, consequentemente, pode ser selecionado outros conjuntos de pixels para corrigir efeitos como flutuações de intensidade da lâmpada. O sistema de feixe duplo simultâneo também corrige qualquer mudança temporal na transmissão da radiação como, nos gases da chama. (WELZ et al., 2005.; WELZ et al., 2003.; VIRGILIO, 2010.; GALLINDO et al., 2005.; RUELLA, 2010)

O HR-CS AAS possui várias vantagens, entre elas o uso de uma única fonte de radiação para todos os elementos, melhor desempenho analítico na determinação de elementos traços em amostras complexas e permite realizar automaticamente medidas multielementares em rápida sequência. Além do seu custo relativamente baixo que torna a técnica de AAS altamente competitiva em relação à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) na relação custo/benefício (WELZ et al., 2005.; WELZ et al., 2003.; SILVA, 2004.; VIRGILIO, 2010).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é avaliar novas estratégias de preparo de amostras empregando o CHDS para a digestão de amostras de rações (cães) para a determinação de macronutrientes (Na e K) e micronutrientes (Fe, Cu, Zn e Mn) por HR-CS FAAS.

3. METODOLOGIA

A seguir será descrito todos os procedimentos de preparo das amostras por digestão no sistema de CHDS e MW para a determinação dos macronutrientes e micronutrientes empregando a HR- CS F AAS.

3.1. AMOSTRAS, REAGENTE E SOLUÇÕES ANALÍTICAS.

As amostras de rações para cães foram adquiridas no pet shop em Araraquara, São Paulo, Brasil. As amostras adquiridas foram a Special dog Ultralife Light, N e D Prime, Guabi Natural, Special dog de frango e arroz, Special dog frango e arroz Junior, Special dog Junior, Special dog vegetais Junior, Special dog vegetais Adultos, Special dog frango e carne Adultos e Special dog frango e arroz Sênior.

A avaliação da exatidão da digestão com o CHDS foi realizada através da digestão de materiais de referência certificados de fígado bovino (*Bovine Liver NIST 1577b*), tecido de mexilhão (*Mussel Tissue Freeze-Dried NIST 2976*) e ração para peixe (*MR-E1002A Ração para peixes Embrapa*).

Para as digestões das amostras foram utilizados HNO_3 65% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e H_2O_2 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em todas as soluções utilizaram-se água deionizada de alta pureza produzida em um sistema de purificação GEHAKA Master System MS2000 ALL (18,2 $\text{M}\Omega$ cm).

As soluções analíticas (0,25 – 3,0 mg L^{-1} Fe, 0,03 – 0,2 mg L^{-1} Cu, 10 – 50 mg L^{-1} Na, 5 – 200 mg L^{-1} K, 0,3 – 1,5 mg L^{-1} Zn e 0,1 – 0,5 mg L^{-1} Mn) foram preparadas por padrões espectroscópicos monoelementares (SpecSol, São Paulo, Brasil) e acidificadas a 5% (v/v) HNO_3 .

Os frascos e as vidrarias utilizadas foram descontaminados por imersão em banho de 10% (v/v) HNO_3 durante 24 horas. Após o banho ácido, foram lavados com água deionizada.

3.2. INSTRUMENTAÇÃO.

As digestões das amostras de ração para cachorro e dos materiais de referência certificados foram realizadas em CHDS (*Registro de Patente BR1020130228249, Instituto Nacional da Propriedade Industrial*) (Figura 18). Para fins comparativos, as amostras foram digeridas em MW (*Multiwave Sample Preparation System, Anton Paar, Graz, Áustria*) (Figura 19).

Figura 18: CHDS.



Fonte: do Autor, 2021.

Figura 19: Forno micro-ondas Anton Paar, modelo Multiwave.



Fonte: do Autor, 2021.

Para a determinação de macronutrientes (Na e K) e micronutrientes (Fe, Cu, Zn e Mn) foi utilizado um HR-CS FAAS (Analytik Jena, modelo contrAA 300) (Figura 20). Utilizou-se a área de integração de 3 pixels e os parâmetros operacionais empregados estão apresentados na tabela 1. As medidas foram realizadas todas em triplicata.

Figura 20: Espectrômetro Analytik Jena contrAA 300.



Fonte: do Autor, 2021.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais do HR-CS FAAS utilizados para determinação de macro e micronutrientes nas amostras.

Elemento	Linha atômica (nm)	Vazão de acetileno (Lh ⁻¹)	Vazão de ar (Lh ⁻¹)	Altura do queimador (mm)
Fe*	248,327	60	486	6
Cu*	324,754	50	486	6
Na*	330,237	90	486	6
Mn*	279,482	80	486	6
Zn*	213,857	50	486	6
K*	404,414	80	486	8

*Linha primária

Fonte: do Autor, 2022.

3.3. PREPARO DAS AMOSTRAS.

As amostras foram maceradas com o uso de almofariz e pistilo (Figura 21). Em seguida, determinaram-se os teores de umidades a partir da secagem em estufa (TE-394/2 Tecnal, Piracicaba, SP) (Figura 22), com circulação e renovação de ar a 75°C até que a massa permanecesse constante. Após a secagem, as amostras foram adicionadas em frascos e armazenadas em dessecador.

Figura 21: Amostras de ração para cachorro maceradas e secas.



Fonte: do Autor, 2021.

Figura 22: Estufa.



Fonte: do Autor, 2021.

3.4. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE DIGESTÃO EM CHDS.

3.4.1. Efeito do HNO_3 , H_2O_2 , temperatura, tempo de patamar e temperatura de pré-digestão.

Foi realizado um planejamento fatorial com cinco variáveis (concentração de HNO_3 , volume de H_2O_2 , temperatura, tempo de patamar e temperatura de pré-digestão) e dois níveis (inferior e superior). Para cada variável foi atribuído um símbolo de V1 a V5, e os níveis foram enumerados em (-1), representando o limite inferior e (1) representando limite superior das variáveis, conforme apresentado na tabela 2. Os valores dos limites (inferior e superior) foram definidos com base nos estudos realizados em CHDS pelos membros do grupo de pesquisa.

Tabela 2: Planejamento fatorial com cinco variáveis e dois níveis.

Variáveis do Planejamento	Símbolo	-1	1
Concentração de HNO_3 (mol L^{-1})	V1	3,5	14,0
Volume de H_2O_2 (mL)	V2	0,5	1,0
Tempo de patamar (min.)	V3	12,0	24,0
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	V4	195,0	225,0
Tempo de pré-digestão (min.)	V5	15,0	30,0

Fonte: Autor, 2021.

Como o planejamento fatorial são com cinco variáveis e dois níveis, o número de experimento seria 2^5 , resultando em um total de 32 possibilidades de combinações. Porém, com intuito de reduzir a quantidade de análise, fez-se um planejamento de 2^{5-2} , resultando em um total de 8 experimentos.

Determinou-se uma sequência de níveis (inferiores e superiores) de V1, V2 e V3 para cada experimento, e para obtermos novas sequências de níveis V4 e V5, foi multiplicado os valores codificados dos níveis V1XV2 e V1XV3, respectivamente. Em seguida, combinou-se todas as variáveis com a variação de todos os níveis, conforme a tabela 3.

Tabela 3: Planejamento fatorial com cinco variáveis, dois níveis e seus valores codificados e reais.

	HNO ₃ (molL ⁻¹)		H ₂ O ₂ (mL)		Tempo de patamar (min.)		Temperatura (°C)		Tempo de pré-digestão (min.)	
Experimentos	V1		V2		V3		V4		V5	
	Codificada	Real	Codificada	Real	Codificada	Real	Codificada	Real	Codificada	Real
1	-1	3,5	-1	0,5	-1	12,0	1	225,0	1	30,0
2	-1	3,5	-1	0,5	1	24,0	1	225,0	-1	15,0
3	-1	3,5	1	1,0	-1	12,0	-1	195,0	1	30,0
4	-1	3,5	1	1,0	1	24,0	-1	195,0	-1	15,0
5	1	14,0	-1	0,5	-1	12,0	-1	195,0	-1	15,0
6	1	14,0	-1	0,5	1	24,0	-1	195,0	1	30,0
7	1	14,0	1	1,0	-1	12,0	1	225,0	-1	15,0
8	1	14,0	1	1,0	1	24,0	1	225,0	1	30,0

Fonte: Autor, 2021.

Uma das amostras de ração para cachorro foi digerida em CHDS de acordo com os experimentos estabelecidos do planejamento fatorial. Em todos os experimentos foram pesados diretamente nos frascos de digestão 100 mg da amostra previamente macerada e seca. Para a digestão do experimento 1, adicionou-se 0,5 mL de HNO₃ (3,5 molL⁻¹) e 2,0 mL de água deionizada. Os frascos foram vedados e deixados para pré-digestão por 30 min em temperatura ambiente. Após a pré-digestão adicionou-se 0,5 mL de H₂O₂ e os frascos foram fechados. O programa de aquecimento partiu da temperatura ambiente até 225°C em 20 min e permanência em 225 °C por 12 minutos, seguido por 30 min de resfriamento, conforme a tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Programa de aquecimento do experimento 1 para digestão das amostras em CHDS.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
RAMPA	T _{ambiente} - 225	20
PATAMAR	225	12
RESFRIAMENTO	225 - 40	30

Fonte: Autor, 2021.

Com a digestão finalizada, a solução digerida foi transferida para frasco de polipropileno e diluída para 25 mL com água deionizada.

3.4.2. Medida do teor de carbono residual na amostra.

Para avaliar a eficiência de decomposição da matéria orgânica dos digeridos, foi realizado as medidas de concentração de carbono residual (RCC) de todos os digeridos. Para esta quantificação, foi utilizado um TOC-L CSH/CSN (Shimadzu, Quioto, Japão), mostrado na Figura 23.

Figura 23: TOC-L CSH/CSN, Shimadzu.



Fonte: Autor, 2021.

O pH das amostras digeridas foi corrigido (5,5 a 6,5), em seguida uma alíquota de 500 μ L foi retirada e avolumada para 50 mL. As amostras foram avaliadas em triplicata.

A partir das medidas de RCC, determinaram-se as variáveis do planejamento fatorial que mais influenciam nas digestões (aquelas que apresentaram os menores RCC) e definiram-se as melhores condições para uma digestão mais completa.

3.4.3. Efeito das concentrações de HNO_3 nas digestões.

Com as variáveis estabelecidas no planejamento fatorial, realizou-se a análise de duas concentrações de HNO_3 (7 e 14 mol L^{-1}). Para isso, pesou-se 100 mg da amostra de CRM de ração para peixe diretamente no frasco de digestão, adicionou-se 1,0 mL ou 2 mL de HNO_3 (7 ou 14 mol L^{-1}) e 1,0 mL de H_2O_2 .

Os frascos foram fechados e inseridos no bloco do CHDS. O programa de aquecimento utilizado está apresentado na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Programa de aquecimento para digestão das amostras em CHDS.

FASE	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TEMPO (min)
RAMPA	$T_{\text{ambiente}} - 195$	20
PATAMAR	195	12
RESFRIAMENTO	195- 40	30

Fonte: Autor, 2021.

A solução digerida foi transferida para frasco de polipropileno e diluída para 25 mL com água deionizada. Em seguida, determinou-se Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na no CRM por HR-CS FAAS para as diferentes concentrações de HNO_3 . As digestões foram realizadas em triplicada.

3.4.4. Efeito das massas nas digestões.

Considerando os resultados obtidos no planejamento fatorial e o estudo do efeito das concentrações de HNO_3 , foi feito um estudo do efeito das massas de amostra nas digestões por CHDS. Para isso foi utilizado o CRM de ração para peixe e as massas de amostra avaliadas foram 50, 100 e 200 mg. Foram utilizados nas digestões 2,0 mL de HNO_3 (14 mol L^{-1}) e 1,0 mL de H_2O_2 . O programa de aquecimento utilizado está apresentado na Tabela 5. As amostras foram digeridas em triplicata. Em seguida, determinou-se Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na no CRM por HR-CS FAAS para as diferentes massas.

3.5. Digestão em CHDS.

Após a otimização do método, as 10 amostras de ração de cachorro e os materiais de referência certificados de ração para peixe, tecido de mexilhão e fígado bovino foram digeridos em CHDS.

Foram pesados diretamente nos frascos de digestão 200 mg das amostras previamente maceradas e secas. Adicionou-se 2 mL de HNO_3 e 1 mL de H_2O_2 . Os frascos foram fechados e inseridos no bloco. O programa de aquecimento utilizado está apresentado na Tabela 5.

A solução digerida foi transferida para frasco de polipropileno e diluída para 25 mL com água deionizada. As amostras ração e os CRMs foram digeridos em triplicata. Os métodos foram avaliados por meio da comparação dos resultados com aqueles obtidos após a decomposição das amostras assistido por radiação micro-ondas.

3.6. Digestão em MW.

Na digestão assistida por radiação micro-ondas em sistemas fechados, foram pesados 200 mg das amostras de rações previamente maceradas e secas, em seguida adicionados em frascos de quartzo. Foram adicionados 2 mL de HNO_3 , 3 mL de água deionizada e 1 mL de H_2O_2 . Os frascos foram fechados, introduzidos no rotor e este inserido no equipamento. Um programa de aquecimento de 3 etapas foi utilizado: (1) 100-500 W, rampa de 5 min; (2) 800 W, patamar de 15 min; (3) 0 W, 15 min de resfriamento, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Programa de aquecimento para digestão das amostras em MW.

FASE	POTÊNCIA (W)	TEMPO (min)
RAMPA	100-500	5
PATAMAR	800	15
RESFRIAMENTO	0	15

Fonte: Autor, 2021.

Com a digestão finalizada, a solução digerida foi transferida para frasco de polipropileno e diluído para 25 mL com água deionizada. As amostras e os CRMs foram digeridos em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

4.1. Teor de umidade.

Os teores de umidade foram definidos com o objetivo de utilizar massa seca das amostras. A Tabela 7 apresenta todos os teores de umidade encontrados.

Tabela 7: Teores de umidade das amostras de ração (para cães).

Amostras	%umidade
1	5,41
2	4,70
3	3,66
4	6,10
5	5,34
6	6,29
7	6,00
8	5,73
9	5,71
10	5,52

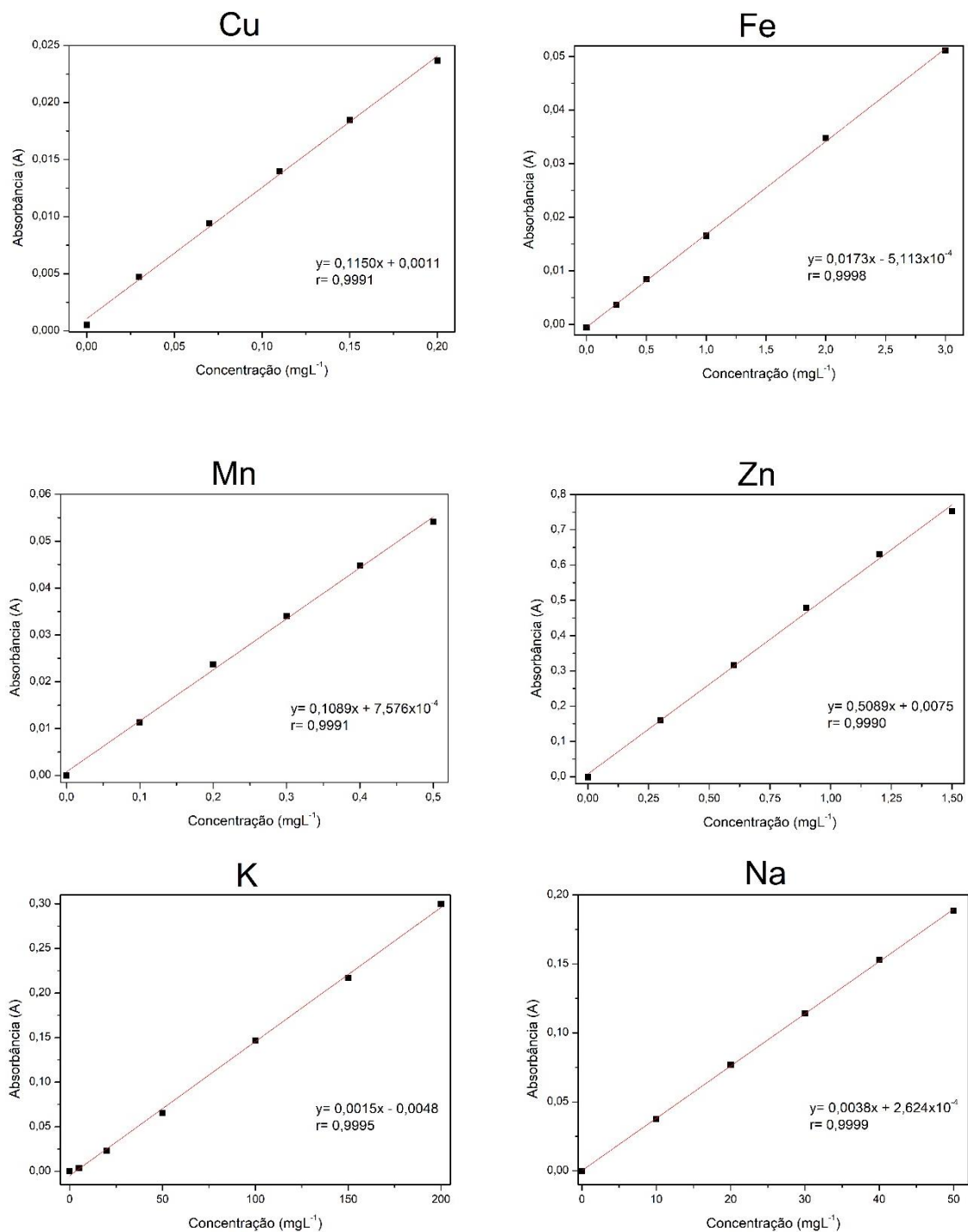
Fonte: Autor, 2020.

Os teores de umidade obtidos foram próximos aos teores das amostras de ração encontradas no mercado.

4.2. Curvas de calibração.

As curvas analíticas dos elementos (Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na) analisados por HR-CS FAAS com absorbância integrada a 3 pixels, apresentaram coeficientes de correlação linear $\geq 0,999$. As curvas obtidas estão apresentadas na figura 24 abaixo.

Figura 24: Curvas analíticas para os elementos a) Cu, b) Fe, c) Mn, d) Zn, e) K e f) Na obtidas por HR-CS FAAS com absorvância integrada a 3 pixels.



Fonte: Autor, 2021.

4.3. Otimização do método de digestão em CHDS.

4.3.1. Planejamento fatorial.

As variáveis de concentração de HNO_3 , volume de H_2O_2 , temperatura, tempo de patamar e temperatura de pré-digestão foram avaliados em dois níveis (inferior e superior) empregando um planejamento fatorial. A partir dos experimentos estabelecidos na tabela 3, realizaram-se as medidas de concentração de carbono residual de todos os digeridos e os valores estão apresentados na Tabela 8.

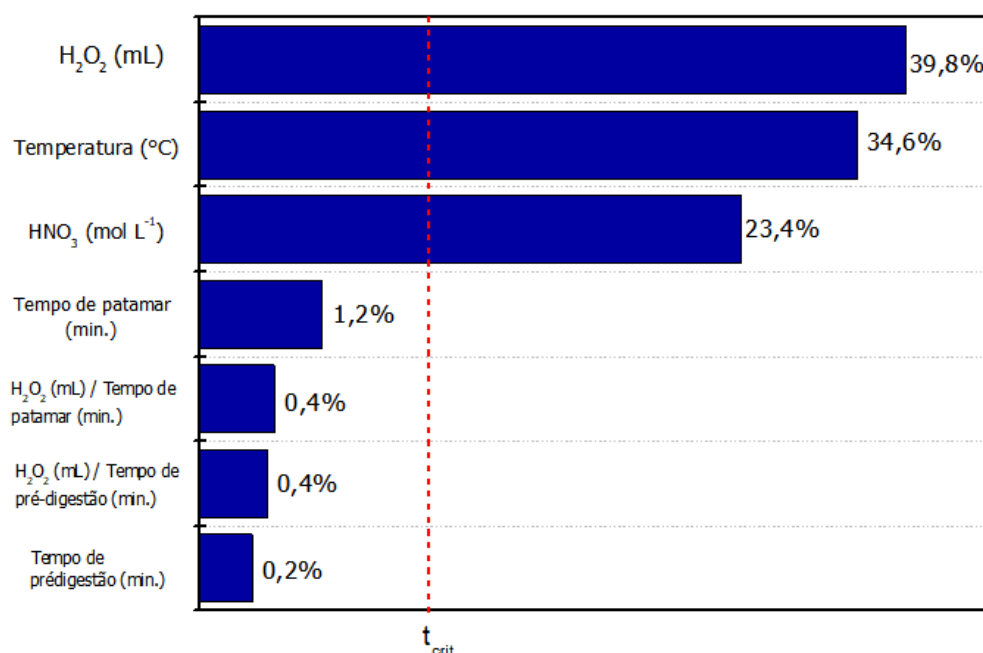
Tabela 8: Teor de carbono residual nos digeridos da amostra utilizando o CHDS.

Experimentos	Carbono residual (mg de C/ 100 mg de amostra)
1	9,65
2	9,48
3	9,35
4	8,98
5	9,46
6	9,65
7	6,81
8	6,05

Fonte: Autor, 2021.

A partir das medidas de RCC, determinaram-se as variáveis que mais influenciam nas digestões (aquelas que apresentaram os menores RCC). As figuras 25 e 26 apresentam os resultados obtidos em termos da influência de cada uma das variáveis.

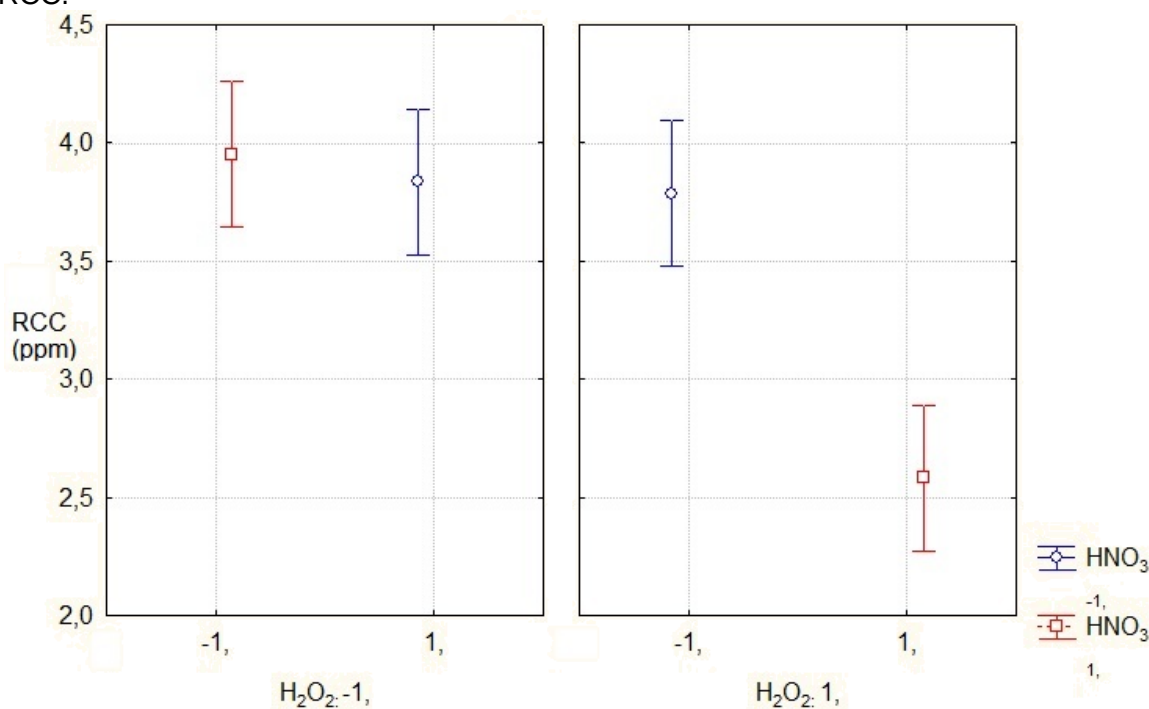
Figura 25: Gráfico de pareto da influência de cada variável nas digestões.



Fonte: Autor, 2021.

Análise da Figura 25 revela que há três variáveis significativas, quais sejam as concentrações de HNO₃, volume de H₂O₂ e temperatura. Esperava-se que a temperatura não fosse uma variável significativa, pois temperaturas de 195 °C e 225 °C apresentam uma diferença de apenas 30°C, porém apesar da pouca variação, a temperatura apresentou ser uma variável significativa, podendo influenciar no desempenho das digestões em CHDS. Por conseguinte, apenas a concentração de HNO₃, volume de H₂O₂ e a temperatura foram considerados significativos para os experimentos seguintes. A Figura 26 apresenta os efeitos dos níveis inferiores e superiores das variáveis concentrações de HNO₃ e volume de H₂O₂.

Figura 26: Gráfico de efeitos da concentração de HNO_3 e volume de H_2O_2 nas medidas de RCC.



Fonte: Autor, 2021.

A Figura 26 permite observar que em maior concentração de HNO_3 e maior volume de H_2O_2 obtêm-se os menores valores de RCC, ou seja, melhores condições para uma digestão mais completa. Consequentemente, o nível superior de concentração de HNO_3 (14 mol L^{-1}) e volume de H_2O_2 (1 mL) foram definidos para as demais digestões.

As variáveis de temperatura e tempo de patamar não foram significativas no experimento, consequentemente considerou-se para os demais experimentos os níveis inferiores (195°C e 12 min), possibilitando-se realizar as digestões em menor tempo de patamar e menor tempo de resfriamento por utilizar temperaturas menores. Além disso, como a variável de pré-digestão também não foi significativo, as demais digestões não se realizaram a pré-digestão, reduzindo-se ainda mais o tempo de análise.

4.3.2. Teor de carbono residual.

De acordo com os dados obtidos de RCC nos experimentos do planejamento fatorial (tabela 8), o valor de teor de carbono residual encontrado variou de 9,65 a 6,05 mg de C/ 100mg de amostra. Com esse resultado pode-se observar que

o método de digestão em CHDS proposto neste trabalho apresentou eficiência, considerando-se que a composição da amostra contém alto teor de proteína (27%) e extrato etéreo (12%), que são componentes ricos em carbono.

Para fins de comparativo, foi calculado o valor estimado da eficiência na decomposição da matéria orgânica (EDMO), conforme calculado segundo o trabalho publicado por Costa et al. (2013). No trabalho de Costa et al. (2013), a EDMO das amostras de ração para cachorro digeridas em MW, variou de 84,2 a 87,6%. Os valores de EDMO foram calculados pela diferença entre carbono total (CT) e residual (CR), dividida por carbono total (CT), isso multiplicado por 100, conforme a equação 3 abaixo (COSTA, 2013).

$$EDMO = \left(\frac{CT - CR}{CT} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

No cálculo de EDMO foi considerado como o valor de carbono total, a massa total de amostra. Portanto, é válido ressaltar que este cálculo é apenas uma estimativa, pelo fato de que o valor de carbono total na amostra não é absolutamente a massa de amostra utilizada, pois a amostra não contém em sua composição 100% de carbono.

Os valores de EDMO calculado variou de 90,4 a 94%. A análise dos resultados revela que o método proposto neste trabalho apresentou eficiência próximas aos resultados apresentados no trabalho publicado por Costa et al. (2013). Porém, esses resultados não são reais, pois as massas de amostras utilizadas não são 100% de carbono total.

4.3.3. Efeito da concentração de HNO₃.

Conforme estabelecido no planejamento fatorial, concentrações de HNO₃ (14 molL⁻¹) obteve-se melhores resultados como de RCC. Portanto, foi realizado uma análise do efeito das concentrações de HNO₃ (7 e 14 molL⁻¹) a fim de determinar a possibilidade de redução da concentração. Para essa avaliação determinou-se Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na no CRM de ração para peixe e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na (mg.kg^{-1}) em material de referência certificado de ração para peixe digerido com CHDS em diferentes concentrações de HNO_3 .

Concentração HNO_3		Elementos (mg.kg^{-1})					
		Fe	Na	Zn	Mn	Cu	K
7 mol.L^{-1}	Certificado	231,9 $\pm$ 20,2	2160,0 $\pm$ 190,0	129,6 $\pm$ 6,8	19,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 0,9	5860,0 $\pm$ 310,0
	Determinado	184,9 $\pm$ 12,2	1875,7 $\pm$ 158,0	114,1 $\pm$ 4,8	14,2 $\pm$ 2,7	6,8 $\pm$ 0,9	4282,1 $\pm$ 130,3
	Rec (%)	79,7	86,8	88,1	73,0	64,3	73,1
14 mol.L^{-1}	Certificado	231,9 $\pm$ 20,2	2160,0 $\pm$ 190,0	129,6 $\pm$ 6,8	19,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 0,9	5860,0 $\pm$ 310,0
	Determinado	208,5 $\pm$ 4,8	1961,4 $\pm$ 7,0	119,4 $\pm$ 1,8	18,4 $\pm$ 2,9	8,4 $\pm$ 0,5	4482,9 $\pm$ 57,2
	Rec (%)	89,9	90,8	92,1	94,4	80,2	76,5

Fonte: Autor, 2021.

De forma geral, as recuperações (100x valor obtido/valor certificado) aumentaram em concentrações de HNO_3 de 14 mol.L^{-1} . Portanto, 14 mol.L^{-1} foi a concentração de HNO_3 escolhida para a continuidade dos experimentos seguintes.

4.3.4. Efeito das massas.

Considerando os resultados obtidos no planejamento fatorial e o efeito da concentração de HNO_3 , uma avaliação do efeito das massas de amostra foi realizada. Foram avaliadas massas de 50, 100 e 200 mg de CRM de ração para peixe. Os resultados obtidos da determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na no CRM para as diferentes massas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na (mg.kg^{-1}) em material de referência certificado de ração para peixe digerido com CHDS em diferentes massas.

Massa (mg)		Elementos (mg.kg^{-1})					
		Fe	Na	Zn	Mn	Cu	K
50	Certificado	231,9 $\pm$ 20,2	2160,0 $\pm$ 190,0	129,6 $\pm$ 6,8	19,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 0,9	5860,0 $\pm$ 310,0
	Determinado	208,0 $\pm$ 37,6	1832,5 $\pm$ 66,5	113,5 $\pm$ 0,8	13,6 $\pm$ 0,9	7,6 $\pm$ 1,5	3562,7 $\pm$ 143,3
	Rec (%)	89,7	84,8	87,6	70,1	72,2	60,8
100	Certificado	231,9 $\pm$ 20,2	2160,0 $\pm$ 190,0	129,6 $\pm$ 6,8	19,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 0,9	5860,0 $\pm$ 310,0
	Determinado	208,5 $\pm$ 4,8	1961,4 $\pm$ 7,0	119,4 $\pm$ 1,8	18,4 $\pm$ 2,9	8,4 $\pm$ 0,5	4482,9 $\pm$ 57,2
	Rec (%)	89,9	90,8	92,1	94,4	80,2	76,5
200	Certificado	231,9 $\pm$ 20,2	2160,0 $\pm$ 190,0	129,6 $\pm$ 6,8	19,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 0,9	5860,0 $\pm$ 310,0
	Determinado	209,4 $\pm$ 2,0	2187,6 $\pm$ 81,1	122,1 $\pm$ 0,7	20,0 $\pm$ 6,7	8,5 $\pm$ 0,1	5487,7 $\pm$ 10,5
	Rec (%)	90,3	101,3	94,2	102,5	81,3	93,6

Fonte: Autor, 2021.

Análise dos resultados apresentados na Tabela 5 revela que de uma forma geral as recuperações (100x valor obtido/valor certificado) aumentaram de 50 para 200 mg. Isto ocorreu por conta de obtenção de massas mais representativas para massas maiores. Assim, 200 mg foi a massa de amostra escolhida para a continuidade dos experimentos.

4.4. Determinação de macronutrientes e micronutrientes por HR-CS AAS.

Dez amostras de ração para cães foram digeridas em CHDS e em forno de micro-ondas (MW-AD) para fins comparativos. Os analitos (Na, K, Fe, Cu, Zn e Mn) foram determinados por HR-CS FAAS empregando os dois sistemas de digestão (CHDS e MW-AD). Os resultados obtidos na determinação por HR-CS FAAS em todos os digeridos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) da determinação (mg.Kg⁻¹) de Na, K, Cu, Fe, Mn e Zn por HR-CS FAAS em ração para cães digeridas em CHDS e MW-AD.

Amostras		Elementos (mg.kg ⁻¹)					
		Fe	Na	Zn	Mn	Cu	K
1	MW-AD	203,2 $\pm$ 2,1	5692,8 $\pm$ 122,2	252,6 $\pm$ 1,1	60,5 $\pm$ 2,1	23,4 $\pm$ 0,0	5095,3 $\pm$ 66,8
	CHDS	235,0 $\pm$ 2,3	5690,6 $\pm$ 282,1	254,9 $\pm$ 8,1	59,8 $\pm$ 0,4	23,3 $\pm$ 0,1	4828,1 $\pm$ 230,2
2	MW-AD	173,8 $\pm$ 12,8	4093,6 $\pm$ 161,5	133,9 $\pm$ 1,5	38,4 $\pm$ 0,6	10,1 $\pm$ 0,1	5726,2 $\pm$ 6,3
	CHDS	181,2 $\pm$ 7,6	4240,1 $\pm$ 18,3	127,6 $\pm$ 6,5	38,4 $\pm$ 0,9	10,4 $\pm$ 0,3	5724,4 $\pm$ 47,8
3	MW-AD	201,3 $\pm$ 4,3	3281,7 $\pm$ 98,9	227,1 $\pm$ 2,1	30,5 $\pm$ 0,2	29,4 $\pm$ 1,2	5083,6 $\pm$ 178,5
	CHDS	222,9 $\pm$ 3,4	3221,2 $\pm$ 94,4	229,4 $\pm$ 0,2	30,6 $\pm$ 0,3	29,9 $\pm$ 1,2	5038,0 $\pm$ 69,8
4	MW-AD	175,8 $\pm$ 8,4	4263,7 $\pm$ 62,2	139,6 $\pm$ 4,2	42,7 $\pm$ 0,6	9,4 $\pm$ 0,6	5951,1 $\pm$ 124,8
	CHDS	200,6 $\pm$ 1,4	4140,5 $\pm$ 182,6	136,6 $\pm$ 3,0	42,7 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 4,7	5834,0 $\pm$ 161,9
5	MW-AD	208,9 $\pm$ 51,9	4987,9 $\pm$ 394,6	121,6 $\pm$ 3,2	41,5 $\pm$ 0,4	12,6 $\pm$ 0,2	5131,6 $\pm$ 61,0
	CHDS	193,7 $\pm$ 5,6	5149,7 $\pm$ 106,5	121,4 $\pm$ 3,8	41,2 $\pm$ 0,3	12,6 $\pm$ 0,2	4957,8 $\pm$ 501,0
6	MW-AD	198,1 $\pm$ 3,5	4795,3 $\pm$ 132,4	127,7 $\pm$ 3,3	40,6 $\pm$ 0,3	11,8 $\pm$ 0,7	4727,5 $\pm$ 158,5
	CHDS	206,4 $\pm$ 9,4	4733,8 $\pm$ 44,9	122,7 $\pm$ 5,9	41,4 $\pm$ 1,0	12,5 $\pm$ 0,3	4702,3 $\pm$ 56,3
7	MW-AD	153,3 $\pm$ 0,6	4252,1 $\pm$ 65,1	168,8 $\pm$ 2,4	55,7 $\pm$ 0,3	9,6 $\pm$ 0,2	5268,1 $\pm$ 156,9
	CHDS	163,5 $\pm$ 0,2	4174,6 $\pm$ 244,9	174,6 $\pm$ 7,7	55,9 $\pm$ 1,4	9,3 $\pm$ 0,6	5281,2 $\pm$ 106,2
8	MW-AD	149,2 $\pm$ 1,0	3810,7 $\pm$ 38,9	118,5 $\pm$ 3,1	46,7 $\pm$ 0,5	9,4 $\pm$ 0,7	6056,6 $\pm$ 107,4
	CHDS	143,7 $\pm$ 5,5	3919,4 $\pm$ 156,9	118,0 $\pm$ 3,9	48,4 $\pm$ 1,8	8,4 $\pm$ 1,0	5875,9 $\pm$ 268,9
9	MW-AD	140,9 $\pm$ 5,5	4281,8 $\pm$ 30,9	135,2 $\pm$ 4,9	47,2 $\pm$ 0,5	10,6 $\pm$ 1,1	4753,3 $\pm$ 83,9
	CHDS	156,3 $\pm$ 16,0	4386,6 $\pm$ 112,9	138,2 $\pm$ 2,2	47,9 $\pm$ 0,1	10,1 $\pm$ 0,6	4660,2 $\pm$ 106,1
10	MW-AD	152,1 $\pm$ 14,0	3382,5 $\pm$ 85,1	139,5 $\pm$ 3,5	38,0 $\pm$ 0,7	11,9 $\pm$ 0,5	5415,8 $\pm$ 80,0
	CHDS	156,8 $\pm$ 9,9	3489,0 $\pm$ 264,5	140,3 $\pm$ 1,5	39,7 $\pm$ 1,9	11,6 $\pm$ 0,5	5477,9 $\pm$ 35,2

Fonte: Autor, 2021.

De acordo com os dados da tabela, de uma forma geral os resultados obtidos utilizando os dois sistemas de digestão estão concordantes entre si. Análises estatísticas obtidas pelo teste F revelou que para todas as amostras digeridas pelos dois procedimentos os desvios padrões são comparáveis estatisticamente em ambos os métodos de digestão ao nível de confiança de 95% (Tabela 12).

Tabela 12: Resultados do teste f com 95% de confiança.

Teste F						
Amostras	Fe	Na	Zn	Mn	Cu	K
1	43,90	5,33	50,19	23,57	9,87	11,88
2	2,88	77,68	12,43	2,37	8,82	71,83
3	13,64	1,10	151,28	1,38	1,02	6,54
4	32,08	8,62	1,94	4,01	59,01	1,21
5	86,65	13,74	1,39	2,52	1,22	67,42
6	7,13	8,70	3,17	8,98	4,57	7,93
7	23,16	14,16	10,61	24,59	7,37	2,41
8	31,59	16,26	1,61	12,64	1,82	6,27
9	8,50	13,37	5,29	10,28	1,67	1,60
10	1,98	9,67	5,85	8,25	1,10	5,16
F _{tab} =199,50						

Fonte: Autor, 2021.

Além do teste F foi feito o teste t, cujos resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados do teste t com 95% de confiança.

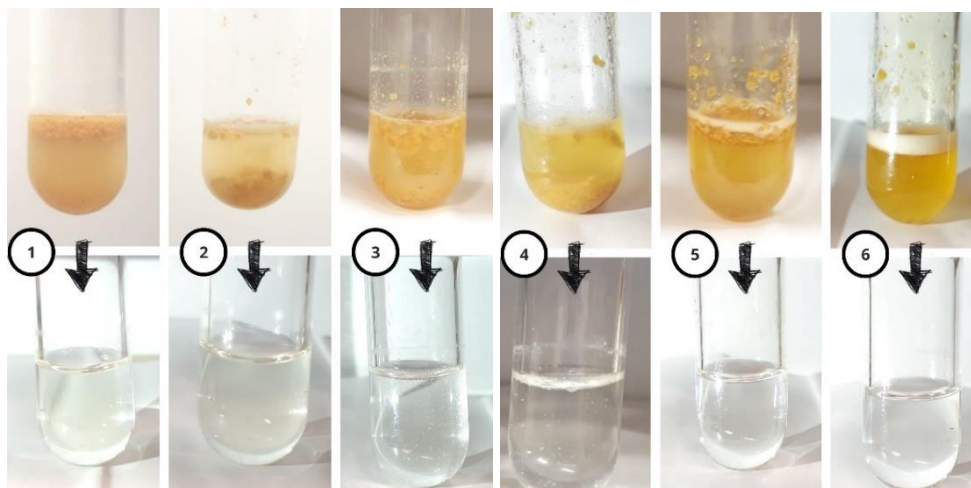
Teste t						
Amostras	Fe	Na	Zn	Mn	Cu	K
1	2,85	0,01	0,39	0,47	0,66	1,58
2	0,71	1,21	3,16	0,05	1,75	3,63
3	3,14	0,68	1,48	0,26	2,94	0,33
4	4,25	1,11	0,83	2,39	0,06	2,66
5	0,41	0,69	0,06	1,21	0,04	0,65
6	2,71	0,76	2,52	1,09	1,21	0,26
7	2,41	0,53	1,24	0,27	0,98	2,18
8	1,86	1,16	0,18	1,29	1,45	1,11
9	1,29	1,55	2,96	1,81	3,94	1,03
10	0,47	0,66	0,36	1,44	0,73	1,00
t _{tab} = 4,30						

Fonte: Autor, 2021.

Análise da Tabela 13 revela que de acordo com o teste t pareado, os resultados obtidos pelos dois sistemas de digestão foram concordantes entre si ao nível de confiança de 95%.

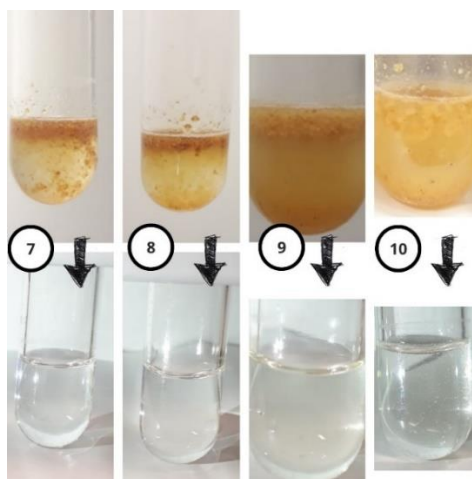
Além disso, foi realizada uma análise visual das amostras antes e depois da digestão em CHDS (Figura 27 e 28). É possível observar que as amostras após a digestão se apresentaram com a coloração límpida, ou seja, obteve-se uma digestão eficiente, visto que a presença de sólidos depositados no fundo do tubo ou suspensos na solução, indicam que a digestão não foi completa.

Figura 27: Solução das amostras de ração para cachorro (1 ao 6) antes e após digestão.



Fonte: do Autor, 2021.

Figura 28: Solução das amostras de ração para cachorro (7 ao 10) antes e após digestão.



Fonte: do Autor, 2021.

4.5. Análise de materiais de referência certificados

A avaliação da exatidão da digestão com o CHDS foi realizada através da digestão de CRM de fígado bovino, tecido de mexilhão e ração para peixe. Os resultados obtidos para macronutrientes e micronutrientes por HR-CS AAS estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados (média $\pm$ desvio padrão) da determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, K e Na (mg.kg^{-1}) em materiais de referência certificados de ração para peixes, fígado bovino e tecido de mexilhão digerido por CHDS.

Amostras		Elementos (mg.kg^{-1})					
		Fe	Na	Zn	Mn	Cu	K
Ração para peixe	Certificado	231,9 $\pm$ 20,2	2160,0 $\pm$ 190,0	129,6 $\pm$ 6,8	19,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 0,9	5860,0 $\pm$ 310,0
	Determinado	209,4 $\pm$ 2,0	2187,6 $\pm$ 81,1	122,1 $\pm$ 0,7	20,0 $\pm$ 6,7	8,5 $\pm$ 0,1	5487,7 $\pm$ 10,5
	Rec (%)	90,3	101,3	94,2	102,5	81,3	93,6
Fígado Bovino	Certificado	184,0 $\pm$ 15,0	2420,0 $\pm$ 60,0	127,0 $\pm$ 16,0	10,5 $\pm$ 1,7	160,0 $\pm$ 8,0	9940,0 $\pm$ 20,0
	Determinado	149,7 $\pm$ 0,2	2638,1 $\pm$ 71,3	123,5 $\pm$ 1,6	8,8 $\pm$ 0,1	123,9 $\pm$ 1,0	7811,2 $\pm$ 95,2
	Rec (%)	81,4	103,0	97,2	84,0	77,4	78,6
Tecido de Mexilhão	Certificado	171,0 $\pm$ 4,9	35000,0 $\pm$ 1000,0	137,0 $\pm$ 13,0	33,0 $\pm$ 2,0	4,0 $\pm$ 0,3	9700,0 $\pm$ 500,0
	Determinado	142,9 $\pm$ 0,3	33130,9 $\pm$ 227,2	134,9 $\pm$ 3,9	29,3 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,1	7791,8 $\pm$ 67,4
	Rec (%)	83,5	94,7	98,5	88,9	93,8	80,3

Fonte: Autor, 2021.

De uma forma geral, boas recuperações foram obtidas e situaram-se entre 81,3 e 101,3% (ração para peixe); 77,4 e 103% (fígado bovino) e 80,3 e 98,5% (tecido de mexilhão). Cerca de 30% de todos os resultados foram concordantes com os valores certificados ao nível de 95% de confiança (teste t). Isto ocorreu devido aos baixos desvios obtidos para as réplicas. Por exemplo, a concentração de Zn determinada em ração para peixe (*MR-E1002A Ração para peixes Embrapa*) não foi concordante com o valor certificado ao nível de 95% (teste t não pareado), embora a recuperação tenha sido de 93%. Pode-se considerar que de uma forma geral os resultados estão satisfatórios para fins de controle de qualidade dessas amostras.

4.6. Limite de quantificação.

O limite de quantificação (LQ) o limite de detecção (LD) foram calculados seguindo as recomendações da IUPAC. O LQ foi calculado como 10 vezes o desvio padrão (σ) do branco (processado dez vezes sucessivamente) dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração. E o LD como sendo três vezes

o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração (SKOOG, 2006).

Os LQ e LD obtidos para os analitos digeridos nos sistemas CHDS e MW-AD estão apresentados na Tabela 15, respectivamente.

Tabela 15: Limites de detecção e quantificação obtidos por CHDS e MW-AD.

Elementos	LD (mg.Kg ⁻¹)		LQ (mg.Kg ⁻¹)	
	CHDS	MW-AD	CHDS	MW-AD
Fe	3,1	3,2	10,3	10,8
Cu	0,9	1,0	3,1	3,4
Na	28,8	38,3	95,9	127,6
Zn	1,1	1,0	3,6	3,5
Mn	0,2	0,2	0,7	0,5
K	16,9	18,0	56,3	60,0

Fonte: Autor, 2021.

Análise da Tabela 15 revela que os LD e LQ obtidos pelos dois sistemas de digestão estão, de uma forma geral, próximos entre si. Isso revela o potencial do sistema CHDS em preparar amostras de ração de cachorro para a determinação de Na, K, Fe, Cu, Zn e Mn por HR-CS FAAS.

5. CONCLUSÃO

O método de digestão em CHDS proposto neste trabalho se mostrou promissor para digestão de amostras de rações para cães para determinação de macronutrientes e micronutrientes por HR-CS FAAS. O sistema apresentou eficiência de digestão, visto que, as amostras de rações contêm em média 12% de teor de gorduras e 27% de teor de proteína, ainda assim, todas as digestões foram completas e os valores RCC variam de 9,65 a 6,05 mg de C/ 100mg de amostra. Além disso, os valores de EDMO calculado variou de 90,4 a 94% que são valores satisfatórios, considerando-se que as composições das amostras de rações são ricas em carbono.

Além da eficiência de digestão, o CHDS é um sistema simples, de baixo custo de instrumentação e seus os componentes podem ser encontrados facilmente no mercado. Outra vantagem do sistema é o menor tempo de digestão comparado com sistemas aberto, pois as digestões em CHDS foram realizadas com apenas 20 minutos de rampa, 12 de patamar e em torno de 30 min de resfriamento, totalizando o tempo de 62 min para digestão de 14 frascos.

Os valores encontrados dos macronutrientes e micronutrientes por HR-CS FAAS foram bem próximos comparados com a digestão por MW-AD. O CHDS permitiu a digestão das amostras com eficiência próximas do MW-AD, o que se torna bastante interessante a utilização do método devido ao baixo custo comparado ao MW-AD. Os limites de detecção e limites de quantificação apresentaram-se valores próximos com às duas técnicas, não comprometendo na determinação dos elementos.

Apesar dos resultados obtidos apresentarem melhores recuperações em concentrações maiores de HNO_3 , ainda assim, o volume de reagentes utilizados é pequeno e a geração de resíduos é mínima, consequentemente, o sistema opera de acordo com as recomendações da química verde.

Além disso, tendo em visto o baixo custo de instrumentação; e considerando o crescimento do setor de alimentos do mercado pet, o emprego do CHDS para digestão de amostras de rações é uma alternativa para empresas de pequeno e médio porte.

Referências

ABINPET. **Mercado pet Brasil**. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação, 2021.

AGAZZI, A.; PIROLA, C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 67, p. 337-341, 2000.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre: Bookman, 2012.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. DA M. Metais: gerenciamento da toxicidade. **Atheneu, São Paulo**, 2003.

BENDICHO, C.; LAVILLA, I.; PENA-PEREIRA, F.; ROMERO, V. Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, p. 1831-1857, 2012.

BORGES, R. F. **Estratégias analíticas para determinação de fosforo em insumos agroindustriais por espectrometria de absorção atômica com fonte continua de alta resolução**. 2009. Dissertação (Mestrado em química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

BUSS, A. **Estrutura de consumo de produtos e serviços para animais de estimação em Porto Alegre**. 2006. **Trabalho de conclusão de disciplina** (Disciplina de Pesquisa em Marketing do curso Graduação em Administração) - Escola de Administração, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CELIK, U.; OEHLENSCHLAGER, J. High contents of cadimium, lead, zinc and copper in popular fisher products sold in Turkish supermarkets. **Food control**, v. 18, p. 258-261, 2007.

COSTA, S. S. L. Determinação e avaliação da composição mineral de rações de cães e gatos dos estado de Sergipe. 2013. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe.**

DE OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: Evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 174– 182, 2003.

DINIZ, E. O bem-estar dos animais. **Pet shop Brasil Business**, ano 9, n.88, abril. 2004.

FARRUKH, M. A. **Atomic absorption spectroscopy**. Rijeka: Intech, 2012.

FASCETTI, A. J.; MORRIS, J. G. Zinc and cooper nutriture in the cat. Nutritional biotechnology in the feed and food insdustries. **Notting, Alltech**, v.1, p.475-479, 2002.

FERREIRA, S. L. C. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307–310, 2013.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, J. C.; KUBOTA, L. T.; KORN, M.; OLIVEIRA, P. V.; ARRUDA, M. A. Z. Influence of microwave heating on fluoride, chloride, nitrate and sulfate concentrations in water. **Talanta**, v.85, p.2707-2710, 2011.

FLORES, É. M. M. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels - A brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 62, p. 1051–1064, 2007.

FRANÇA, J., SAAD, F. M. O. B.; SAAD, C. E. P., SILVA, R. C.; REIS, J. S. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.222-231, 2011.

GALLINDO, D. L. B, JOSÉ, A. C. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**. V.1, p.1-8, 2005.

HOENIG, M. E.; KERSABIEC, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochimica Acta Part B**. v.51, p. 1297-1307, 1996.

KRUG, F. J. E R., PIOVEZANI, F. R.. **Métodos de Preparo de Amostras Para Análise Elementar**. São Paulo: Edit SBQ, 2016.

KRUG, F. J. **Método de preparo de amostras**: fundamentos de preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba, 2010. 340p.

KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; DE OLIVEIRA, P.V. **Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1**: Fundamentos e atomização com chama, 2004. Disponível: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4292094/mod_resource/content/1/Apostila AAS-parte 1.pdf. Acesso em 11 abr. 2021.

LEHTIM, E. A.; VAISANEN, A. Determination of metal concentrations in certified plastic reference materials after small-size autoclave and microwave-assisted digestion followed with inductively coupled plasma optical emission. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy Received**. v.1, p.20, 2016.

MARICHALAR, X.G. **El mercado de la alimentación y accesorios para mascotas em Brasil**. São Paulo: ICEX, 2006. Disponível em: <www.icex.es/icex/cma/contentTypes/common/records/viewDocument/0,,,00.bin?doc=581876>.

MEEKER, D. L. Essential rendering: all about the animal by-products industry. **Arlington: Kirby Lithographic Company, Canadá**, v.1, p.1-302, 2006.

MICHAEL, D.; MINGOS, P.; BAGHURST, D. R. **Fundamentals of microwave application:** Microwave-enhanced chemistry: fundamentals, sample preparation, and applications. Washington: American Chemical Society, 1997. 3-53.p.

MIRANDA, K.; PEREIRA FILHO, E. R.; GOMES NETO, J. A. A new closed-vessel conductively heated digestion system: fostering plant analysis by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, p. 825-831, 2014.

MIRANDA, K.; VIEIRA, A. L.; GOMES NETO, J. A. High-throughput sugarcane leaf analysis using a low cost closed-vessel conductively heated digestion system and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 6, p. 9503–9508, 2014.

NAVARRETE, M. L.; JONATHAN, M. P.; RODRÍGUEZ, P. F.; SALGADO, J. A. G. Autoclave decomposition method for metals in soils and sediments. **Springer Science**, v.1, p.2285-2293, 2010.

PINOW, A. C. S.; SANTOS, J. S.; MAZZINGHY, C. L.; PINTO, M. L. Exigências nutricionais de cães filhotes: Revisão. **Pubvet**, v.15, p.1-9, 2021.

RICHTER, R. C.; LINK, D.; KINGSTON, H. M. Microwave-enhanced chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 31A-37A, 2001.

RUELLA, D. O. **Avaliação da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução no desenvolvimento de métodos analíticos para diagnóstico foliar de cana de açúcar e laranja.** Tese (Doutorado em química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SANTOS, C. **Composto de marketing de rações para cães.** 2017. Monografia (Curso de Especialista em Gestão do Agronegócio)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SIQUEIRA, E. M. A.; ALMEIDA, S. G.; ARRUDA, A. Papel adverso do ferro no organismo. **Comunicação em ciência e Saúde**, v.17, p.229-236, 2006.

SKOOG, D. A., WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. Norte-americana, 2008.

ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; MENDIL, D.; SOYLAK, M. Trace metal content in nine species of fish from the Black and Aegean Seas, Turkey. **Food chemistry**, v.104, p.835-840, 2007.

VIEIRA, A. L. **Aperfeiçoamento e avaliação de um novo sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para preparar amostras de carne “in natura” para análise elementar**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

VIRGILIO, A. **Determinação de enxofre em amostras agroindustriais por espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e alta resolução**. 2010. Dissertação (Mestrado em química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3.ed., Weinheim: VCH, 1999.

ZICKER, S. C. Evaluating pet food's: how confident are you when you recommend a commercial pet food's?. **Topics in companion animal medicine**, v.23, p.121-126, 2008.

ZLOTORZYNSKI, A. The Application of Microwave Radiation to Analytical and Environmental Chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.25, p.43-76, 1995.