

## EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn e Zn EM AMOSTRAS DE ARROZ COMERCIAIS

Geovane S. Oliveira<sup>1</sup>; Marcos A. Bezerra<sup>1</sup>; Sulene A. Araújo<sup>1</sup>; Clinzen F. Cletch<sup>1</sup>; Lais S. Gomes<sup>1</sup>; Maicon C. T. Almeida<sup>1</sup>; João V. R. Santos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Jequié/Ba – Av. José Moreira Sobrinho S/N

**Palavras-Chave:** Metais, Segurança alimentar, Energia Ultrassônica

### Introdução

Ao longo dos anos, avanços científicos e tecnológicos têm aprimorado a avaliação da qualidade nutricional dos alimentos, explorando informações desconhecidas ou até mesmo pouco estudadas devido à complexidade da amostra analisada. No contexto brasileiro, as Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos (TACO e TBCA), além das recomendações da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), tem desempenhado um papel significativo na construção de dados fornecendo informações detalhadas sobre a composição dos alimentos consumidos no país, contribuindo para segurança alimentar e nutricional. <sup>[1,2]</sup>

Apesar das tabelas serem essenciais para o controle da ingestão diária de nutrientes e correlacionarem-se com o estado nutricional do indivíduo, há situações em que os dados fornecidos não são suficientes, especialmente ao analisar alimentos complexos, assim se faz necessária a utilização de métodos analíticos avançados para averiguar os analitos presentes nas matrizes alimentares. Esses métodos permitem uma análise mais rigorosa e precisa da composição dos alimentos, identificando, quantificando nutrientes específicos, como metais e minerais, e monitorando possíveis contaminantes. <sup>[3, 4, 5]</sup>

Os minerais são compostos inorgânicos ingeridos principalmente através da alimentação e desempenham importantes funções metabólicas no organismo. Além disso, a deficiência ou o excesso de alguns minerais no organismo humano estão associados a várias doenças. Dentre as principais doenças associadas ao acúmulo ou falta de minerais essenciais destacam-se a anemia ferropriva e a Hemocrematose relacionadas à deficiência e excesso de ferro (Fe) e o atraso no crescimento em crianças relacionada a deficiência de zinco (Zn). Além disso, o manganês (Mn) possui um papel importante na saúde óssea, onde a falta desse mineral pode causar vários problemas. <sup>[6, 7]</sup>

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através da Resolução RDC N° 269, de 22 de setembro de 2005 (Brasil, 2005), estabelece os valores de referência para ingestão diária de alguns nutrientes minerais, dentre estes Fe, Zn e Mn, os quais apresentam limites estabelecidos de 14 mg, 7 mg e 2,3 mg para adultos, respectivamente. Para crianças os limites de ingestão para tais metais são 6 mg, 4,1 mg e 1,2 mg. Contudo, a ingestão diária de tais metais ainda é inferior ao recomendado. <sup>[3]</sup>

A análise de metais em alimentos é amplamente realizada em diversos laboratórios, utilizando diferentes procedimentos de preparo de amostras e diferentes técnicas analíticas. Dentre as técnicas mais amplamente utilizadas para a determinação desses metais está a espectrometria de emissão atômica, espectrometria de absorção atômica, espectrometria de

emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. [4]

Na atualidade, há diversas metodologias propostas para a determinação de metais em matrizes alimentares que utilizam procedimentos de preparo de amostras convencionais, como a digestão ácida por via úmida com frasco aberto em bloco digestor e a digestão ácida por via úmida com bomba de digestão. Contudo, esses métodos são laboriosos, onde demandam a utilização de reagentes concentrados e/ou com um meio de alta temperatura e pressão, além da necessidade de muito tempo para ser executado. [4]

Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias simples, utilizando técnicas com um baixo custo e mais acessíveis de análise tais como a Espectroscopia de absorção atômica (FAAS), é muito importante. Assim, procedimentos de preparo de amostras simples, rápidos, eficientes e com custos reduzidos têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de metais em diversas amostras. Dentre esses procedimentos, destaca-se a extração assistida por ultrassom. [4, 5]

O uso da energia ultrassônica tem sido uma ótima alternativa na extração de metais, devido a maior rapidez durante o processo de extração da amostra, quando comparados com outros métodos convencionais. Além disso, uma outra vantagem é minimizar as possíveis perdas de elementos voláteis, pois aceleram o processo de decomposição sem a necessidade de aquecer a amostra. O processo de extração baseia-se na ação de ondas mecânicas de baixa frequência, as quais são responsáveis pela formação e colapso de microbolhas ocasionando áreas pontuais de alta pressão e temperatura na solução. A ação do ultrassom facilita a extração dos elementos, a sedimentação do material particulado em suspensão e promove a quebra de células vegetais. Além disso, extração assistida por ultrassom é de simples operação e eficiente para extração de elementos em amostras de alimentos, não necessitando de longos períodos para o preparo das amostras nem da utilização de altas temperaturas e pressão elevada. [4, 5, 10]

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para determinação de Fe, Zn, Mn em amostras de arroz por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) utilizando a extração assistida por ultrassom para o preparo das amostras. Primeiramente foi realizada a otimização das variáveis (tempo de extração, massa da amostra e concentração do ácido extrator), aplicando o planejamento experimental Doehlert em um mix de 5 tipos de arroz (branco, preto, vermelho, integral e parboilizado). Após obter os valores ótimos aplicou-se o método estudado para a determinação desses elementos nos 5 diferentes tipos de arroz. Posteriormente, realizou-se a comparação dos resultados obtidos com os valores nutricionais informados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA.

A relevância deste trabalho está profundamente alinhada com a necessidade do monitoramento das espécies químicas nos alimentos, contribuindo para a avaliação da segurança alimentar e para prevenção de riscos. As implicações práticas dos resultados obtidos podem influenciar de maneira significativa nas metodologias de análises em amostras de arroz.

## **Material e Métodos**

Dentre os reagentes utilizados na extração assistida por ultrassom e na digestão ácida por via úmida incluem-se o Ácido Nítrico P.A (Aldrich Chemical Co.), com pureza de 70% e

Peróxido de Hidrogênio P.A (NEON Co.) com pureza de 35%. Para determinação das concentrações dos analitos a partir das absorvâncias foi aplicado o método do padrão externo, com isso foram utilizadas as soluções-padrão para AAS de Fe, Zn e Mn de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, Suíça), diluídas nas seguintes concentrações: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2 e  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

As soluções foram preparadas em vidrarias previamente descontaminadas em banho de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 5% v.v<sup>-1</sup> por 24 horas, utilizando para posterior enxague água deionizada.

Utilizou-se amostras de arroz comercial de 5 tipos, (parboilizado, integral, branco e preto), adquiridas no comércio local do município de Jequié – BA. Todas as amostras foram submetidas há um pré-preparo, no qual houve a secagem das amostras em  $70^\circ\text{C}$  na estufa (SL-100 - Estufa de Secagem e Esterilização - Solab). Posteriormente, foram trituradas com grau e pistilo e peneiradas para homogeneização e aumento da superfície de contato e armazenadas em tubos tipo Falcon graduados de 15 mL com tampa de rosca (Corning) até o momento das extrações.

No procedimento de extração um equipamento de banho ultrassom (Cristófoli, Campo Mourão - PR) foi utilizado para promover as extrações. Adicionou-se cerca de 2,8 L de água à cuba do equipamento de ultrassom, na qual tubos cônicos graduados de centrifuga foram colocados, um por vez, sempre na mesma posição (no centro da cuba de ultrassom) para promover a extração. As quantidades de amostra (0,2 g), concentração de  $\text{HNO}_3$  ( $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e tempo de ultrassom (25 min.) foram previamente estabelecidos após otimização simultânea do método com planejamento experimental Doehlert.

A extração foi realizada em 5 tipos de arroz (parboilizado, integral, vermelho, branco e preto). Todo procedimento foi realizado em triplicata, as amostras foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU/MARTE ANALÍTICA - MODELO ATX-224R) mediu-se aproximadamente 0,2 g e adicionou aos tubos cônicos. Em seguida, foram adicionados entre 1490  $\mu\text{L}$  de solução extratora ( $\text{HNO}_3$ ) e 3510  $\mu\text{L}$  de água deionizada formando uma solução de  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , os tubos foram submetidos a um banho de ultrassom à 25 minutos a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Após, os tubos foram retirados do banho ultrassônico e filtrados com auxílio de um papel filtro C41(Unifil) e os filtrados foram centrifugadas a 3500 rpm por cinco minutos e o sobrenadante retirado e avolumado em tubos tipo Falcon em 10 mL e utilizado para quantificação de Mn, Zn e Fe através da técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

Para a digestão ácida das amostras por via úmida, aproximadamente 0,2 g de arroz foram pesados e transferidos para tubos de Kjeldahl. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de  $\text{HNO}_3$  e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As amostras foram aquecidas em um bloco digestor, inicialmente a  $25^\circ\text{C}$  e depois a temperatura foi aumentada e estabilizada em  $110^\circ\text{C}$  por 2 horas. Após o processo de digestão, as soluções resultantes foram filtradas e diluídas até 10 mL em tubos tipo falcon com água deionizada, para posterior análise. A quantificação de Fe, Mn, Zn foi feita por espectrometria de absorção atômica com chama, o método do padrão externo foi aplicado com soluções padrões desses metais com concentrações variando entre 0 e  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

As análises foram feitas em triplicata e as amostras em branco, contendo todos os reagentes exceto a amostra, foram analisadas paralelamente para identificar possíveis contaminações nos reagentes ou no procedimento.

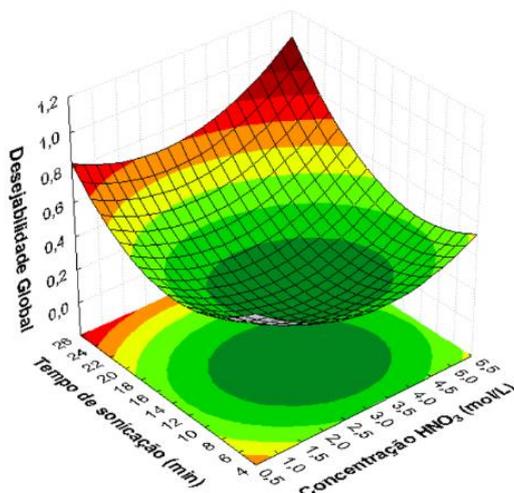
## Resultados e Discussão

Para otimização do procedimento de extração assistida por ultrassom, o planejamento Doehlert foi aplicado para otimizar a extração dos 3 metais, simultaneamente, no qual 7 experimentos foram realizados em duplicatas. Dois fatores foram estudados: a influência do tempo de sonicação e da concentração de  $\text{HNO}_3$  no processo de extração. [8, 9, 10]

O modelo quadrático ajustado foi usado para prever a resposta global, baseada na função de desejabilidade possibilitando obter a superfície de resposta apresentada na Figura 1. Devido às características da matriz Doehlert, as variáveis concentração de ácido nítrico e tempo de extração (5 – 25 min) foram estudadas em cinco níveis e três níveis, respectivamente. Na etapa de otimização utilizou-se um mix contendo as cinco amostras de arroz de modo a obter-se uma melhor representatividade das amostras estudadas. [8, 9, 10]

A concentração do ácido extrator foi otimizada através da avaliação do efeito de soluções extratoras com concentrações de  $\text{HNO}_3$  entre  $1,0$  e  $5,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , sobre a extração de Fe, Zn e Mn em um mix de arroz. As soluções extratoras com concentrações de  $\text{HNO}_3$  entre 4 e  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  proporcionaram uma melhora na extração dos analitos de forma simultânea, verificada através do aumento da concentração obtida para todos os elementos na amostra. Conforme utiliza-se soluções de concentrações maiores que  $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido extrator resulta na supressão do sinal analítico devido ao elevado teor de ácido na solução. Isso pode ocorrer pois altas concentrações de ácido podem alterar as propriedades físico-químicas da amostra, ocasionando interferências.

Figura 1. Superfície de resposta obtida após o ajuste de uma função quadrática à desejabilidade global.



O tempo de extração, ou seja, tempo em que a amostra foi submetida à ação do ultrassom, é outro parâmetro fundamental que deve ser otimizado, nesse caso a eficiência de extração dos analitos foi avaliada com tempos de 5, 15 e 25 minutos de ação do ultrassom. Com isso, os resultados demonstraram que as condições ótimas para o tempo de extração de 25 min e a concentração de  $\text{HNO}_3$  de  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  possuem uma maior eficiência na extração dos analitos, uma vez que nessas condições foram obtidas concentrações médias de Fe, Zn e Mn

relativamente superiores as outras regiões estudadas. A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento experimental com projeção sob face quadrada para a otimização das variáveis do método descritas anteriormente.

Tabela 1. Matriz do planejamento Doehlert para otimização da concentração do ácido e tempo de sonicação em procedimento de extração de metais assistida por ultrassom.

Exp.	Variáveis Independentes		Absorbâncias encontradas		
	[HNO <sub>3</sub> ] (mol·L <sup>-1</sup> )	Tempo de extração (min)	Mn Abs.	Zn Abs.	Fe Abs.
1	2,0	25	0,0967	0,378	0,0342
2	4,0	25	0,124	0,306	0,0527
3	1,0	15	0,125	0,239	0,0321
4	3,0	15	0,0625	0,161	0,0336
5	5,0	15	0,0681	0,150	0,0457
6	2,0	5	0,0933	0,214	0,0272
7	4,0	5	0,0789	0,273	0,0378

Absorbância - Abs. Valores obtidos via FAAS. Experimentos feitos – Exp.

Com base nos resultados obtidos na otimização, os parâmetros de mérito limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) foram determinados para o método proposto. Os valores de LOD e LOQ para o método foram obtidos considerando todas as etapas envolvidas na metodologia proposta e expressos na mesma unidade de concentração dos analitos nas amostras.

Para as análises de Fe os valores LOD e LOQ obtidos foram 2,553  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e 7,735  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente. Para Zn e Mn os valores obtidos para o LOD e o LOQ foram respectivamente de 2,493  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 7,555  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 0,654  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e 1,983  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , sendo estes adequados para análise desses elementos em amostras de arroz. A precisão foi avaliada em função do RSD, sendo que os valores obtidos foram 17,72%, 13,79% e 16,93% para Fe, Zn e Mn, respectivamente. Assim, o método proposto apresentou parâmetros de méritos adequados para a determinação da concentração de Fe, Zn e Mn em amostras arroz.

Tabela 2. Parâmetros de validação para o método de solubilização ácida com HNO<sub>3</sub> proposto.

Analito	Fe	Zn	Mn
LOD ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	2,553	2,493	0,654
LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	7,735	7,555	1,983
RSD (%)	17,724	13,791	16,933

A verificação da exatidão do método proposto, utilizando extração assistida por ultrassom, foi realizada através da comparação dos resultados obtidos com as concentrações dos elementos obtidas utilizando a digestão ácida por via úmida, procedimento frequentemente utilizado para o preparo de amostras de alimentos para análise de metais. A comparação dos

resultados obtidos utilizando extração assistida por ultrassom e por digestão ácida por via úmida, para 5 amostras de arroz de diferentes tipos está apresentada na Tabela 3.

Considerando um nível de significância de 5%, utilizando o teste *t* pareado de Student para comparação de duas médias experimentais, verificou-se que em todas as amostras de arroz para os elementos Fe e Zn não diferem estatisticamente, aceitando então a hipótese de que as médias dos resultados obtidos por digestão ácida através da via úmida são equivalentes às obtidas através da extração assistida por ultrassom, demonstrando a exatidão do método proposto. Foram determinados os valores de *t* calculado e comparou-se com o valor crítico da distribuição estatística. Os valores de *t* para Fe, Zn e Mn respectivamente são:  $\pm 1,37561$ ,  $\pm 2,4265$ ,  $\pm 3,23287$ . O valor crítico da distribuição *t* para um nível de 5% de significância (95% de confiança) é aproximadamente  $\pm 2,776$ .

Com base no teste *t* pareado e nos dados obtidos, não há evidência estatística suficiente para afirmar que existe uma diferença significativa entre os dois métodos (método desenvolvido e método existente) em um nível de confiança de 95% para quantificação de Fe e Zn, com isso a hipótese nula é aceita.

O método proposto foi aplicado para a determinação da concentração de Fe, Zn e Mn em 5 amostras de Arroz, de lotes únicos, obtidas no comércio local do município de Jequié-BA, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Considerando as amostras analisadas, todas obtiveram êxito na quantificação dos analitos, pois as concentrações encontradas estavam acima do LOQ estabelecido para o método. Os resultados obtidos para as amostras analisadas foram posteriormente comparados com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA.

Tabela 3. Concentração de Fe, Zn e Mn em amostras de Arroz obtidas por extração assistida por ultrassom e digestão por via úmida.

Amostra	Extração Assistida por Ultrassom			Digestão Ácida ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
	Fe ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Mn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Fe ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Mn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Integral	$31,95 \pm 0,60$	$56,17 \pm 3,70$	$120,99 \pm 3,68$	$73,77 \pm 10,8$	$85,54 \pm 9,34$	$152,63 \pm 12,0$
Vermelho	$27,01 \pm 1,98$	$31,84 \pm 2,28$	$50,45 \pm 1,50$	$57,63 \pm 13,7$	$90,80 \pm 5,77$	$81,71 \pm 12,3$
Parboilizado	$14,91 \pm 7,03$	$15,60 \pm 3,90$	$13,26 \pm 3,73$	$20,87 \pm 7,18$	$20,71 \pm 3,41$	$22,50 \pm 2,73$
Branco	$23,23 \pm 12,4$	$18,91 \pm 1,02$	$10,81 \pm 3,93$	$20,99 \pm 2,63$	$21,09 \pm 5,95$	$14,42 \pm 0,74$
Preto	$20,92 \pm 1,51$	$29,54 \pm 2,44$	$41,28 \pm 2,33$	$281,45 \pm 35,8$	$58,33 \pm 10,4$	$82,94 \pm 18,4$

Fe, LOQ =  $7,735 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Zn, LOQ =  $7,555 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Mn, LOQ =  $1,983 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados expressos na Tabela 4 representam as concentrações de Fe, Zn e Mn em cada tipo de arroz estudado, com uma massa de aproximadamente de 0,2 g. Com isso, comparou-se as concentrações obtidas com base na extração assistida por ultrassom, onde para Fe e Zn todas as amostras possuem uma concentração superior a estimada pela TBCA, exceto para arroz preto, o qual possui uma concentração de Fe, Zn e Mn maiores que as obtidas pela extração. Para Mn, as amostras de arroz integral, vermelho e parboilizado denotaram uma concentração maior que a tabela de referência, mas as amostras de arroz branco e preto evidenciaram uma concentração menor do metal.

Tabela 4. Concentrações estabelecidas pela tabela TBCA para 0,2 gramas de amostras.

Amostra	Fe ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Mn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Integral	10,4	24,1	21,8
Vermelho	12,1	22,2	30,5
Parboilizado	12,4	16,2	17,1
Branco	4,1	12,1	12,1
Preto	30,1	40,1	70,5

## Conclusões

O método proposto para determinação de Fe, Zn e Mn em amostras de arroz, utilizando a extração assistida por ultrassom e concentrações baixas de ácido extrator, mostrou-se simples e preciso. Uma das principais vantagens da metodologia é o tempo reduzido de análise, resultado da simplicidade e eficiência do procedimento experimental envolvido para o preparo da amostra e determinação dos analitos.

Além disso, o método apresentou alta eficiência na extração dos analitos, com concentrações médias de Fe, Zn e Mn superiores às obtidas por outros métodos convencionais, como a digestão ácida por via úmida. Os resultados obtidos, a rapidez do processo, sua simples aplicação, a minimização das perdas de elementos voláteis e a não necessidade de altas temperaturas e pressão elevada são outras características importantes que destacam a eficiência e praticidade do método, apontando assim uma efetividade melhor para a extração assistida por ultrassom.

Os diferentes tipos de arroz que foram analisados apresentaram diferenças quanto aos constituintes de sua formulação. Ainda pode-se destacar que na maioria das amostras analisadas as concentrações de Fe, Zn e Mn obtidas foi acima do especificado pela tabela TBCA. Assim, o controle de qualidade adequado e que apresente resultados precisos quanto à concentração de metais é de extrema importância, já que muitas dietas são elaboradas com base nos valores informados nos rótulos dos produtos e das tabelas de referências.

## Agradecimentos

Agradecemos à CAPES, CNPq, FAPESB pelo suporte e contribuições fundamentais para a realização deste trabalho.

## Referências

- [1] Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO)/NEPA – UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl.- Campinas: NEPA-UNICAMP, p. 161, 2011.
- [2] Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 6.0. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca/>.
- [3] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.
- [4] KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. (Ed.). Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2. ed. São Paulo: Edit SBQ, 2017.



- [5] ORESTE, Eliézer Quadro; SOUZA, Alexander Ossanes de; PEREIRA, Camila Corrêa; VIEIRA, Mariana Antunes; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Decomposição ácida assistida por ultrassom para a determinação de Cu, Fe, Mg e Zn por F AAS em cerâmicas de uso doméstico. Fev. 2017.
- [6] ROY, Choudhury S. A rare cause of chronic heart failure. *British Medical Journal (BMJ)*, 2023. Disponível em: <https://casereports.bmj.com/content/16/6/e253697>. Acesso em: 11 set. 2024.
- [7] ISLAM, Md Salehuddin; SARWAR, Sayedur Rahman. Zinc deficiency: An emerging health problem in children. *Tropical Pediatrics*, v. 55, n. 5, p. 324–329, 2023. Disponível em: <https://academic.oup.com/tropej/article/55/5/324/1676829>. Acesso em: 11 set. 2024.
- [8] CERQUEIRA, U. M. F. M.; BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; ARAÚJO, R. J.; SILVA, B. N.; NOVAES, C. G. Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review. *Food Chemistry*, v. 364, p. 130429, 1 dez. 2021.
- [9] SILVA, J. A.; SANTOS, M. C.; OLIVEIRA, R. S.; LIMA, A. C. Doehlert design in the optimization of ultrasound assisted dissolution of fish fillet samples with tetramethyl ammonium hydroxide for metals determination using FAAS. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v. 154, p. 104-110, jan. 2020.
- [10] BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P. dos; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M. F. da M.; ALVES, J. P. dos S. Otimização simultânea de múltiplas respostas e sua aplicação em Química Analítica – Uma revisão. *Talanta*, v. 194, p. 941-959, 1 mar. 2019.