

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE CONSTITUINTES
INORGÂNICOS EM TECIDO, LÍQUIDO RUMINAL E
FEZES DE BOVINOS DA RAÇA NELORE
(*BOS TAURUS INDICUS*)**

Mykaelli Andrade Santos*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*** bolsista: CNPq (Processo 164886/2018-4)**

São Carlos – SP
2020

“Tudo tem seu tempo. Há um momento oportuno
para cada coisa debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

À minha família pela compreensão nas minhas decisões.
Minha mãe Givanda, meu pai Valter e minha irmã Mychelli,
fontes de companheirismo, cumplicidade e amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por transformar minha fragilidade em coragem, firmeza e forças para chegar até aqui.

Aos meus pais, Givanda e Valter, que sempre incentivaram e nunca mediram esforços para a formação das suas filhas. Agradeço por toda dedicação, confiança, amor e apoio. À minha irmã Mychelli, por sempre me apoiar e me fazer sentir a pessoa mais forte e corajosa desse mundo. Amo vocês!!

Ao meu namorado Carlos, por aceitar e apoiar todas as minhas decisões, por me incentivar a ser cada dia mais uma pessoa melhor e pela leveza que a sua presença traz na minha vida.

Agradeço à Dr^a Ana Rita pela orientação, por todo o conhecimento proporcionado, apoio e confiança depositada em mim. És um grande exemplo de ética, profissionalismo, serenidade e generosidade. Obrigada por tudo!!

Aos professores Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho e Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega por todas as discussões e conhecimento compartilhado.

Ao Grupo de Análise Instrumental Aplicada, do qual tive o prazer de fazer parte. Obrigada pelas conversas, incentivos e contribuições. Em especial à Ana Beatriz, Ivero, Julymar, Herick e Raiza pela convivência diária, por sempre estarem dispostos a ajudar e pela amizade.

Ao Dr. Bruno Andrade, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste por todo suporte técnico e por sempre se disponibilizarem em ajudar naquilo que era necessário.

Ao Departamento de Química, ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela infraestrutura e serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

Aos amigos de São Carlos, pela companhia, boas risadas e momentos incríveis durante esses dois anos, em especial à George, companheiro de apartamento, pela ótima convivência, por todo incentivo e amizade.

Aos membros da banca pelas correções e valiosas sugestões.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse sonho.

Muito obrigada!!

LISTA DE ABREVIações

- CCD** – Dispositivo de carga acoplada (Charge-coupled device)
- CCT** – Tecnologia de celas de colisão (Collision cell technology)
- CRI** – Interface de reação-colisão (Reaction-collision interface)
- CRM** – Material de referência certificado (Certified reference material)
- DRC** – Cella dinâmica de reação (Dynamic reaction cell)
- DSC** – Combinador espectral dicróico (Dichroic spectral combiner)
- ICP-MS** – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma mass spectrometry)
- ICP-MS/MS** – Espectrometria de massa e configuração tandem com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma tandem mass spectrometry)
- ICP OES** – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)
- IS** – Padronização interna (Internal Standardization)
- LDA** – Análise discriminante linear (Linear discriminant analysis)
- LOD** – Limite de detecção (Limit of detection)
- LOQ** – Limite de quantificação (Limit of quantification)
- MEC** – Calibração por múltiplas energias (Multi-energy calibration)
- MFC** – Calibração de fluxo múltiplo (Multi-flow calibration)
- MW** – Micro-ondas (Microwave)
- NIST** – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (National Institute of Standards and Technology)
- PCA** – Análise de componentes principais (Principal component analysis)
- PCA-DA** – Análise discriminante por análise de componentes principais (Principal component analysis discriminant analysis)

PCs – Componentes principais (Principal components)

RF – Floresta randômica (Random forest)

SA – Adição de padrão (Standard addition)

SDA – Análise por adição de padrão (Standard dilution analysis)

SVDV – Visão dupla vertical síncrona (Synchronous vertical dual view)

PIB – Produto interno bruto

WRI – Instituto de recursos mundiais (World Resources Institute)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado no desenvolvimento de métodos de preparo para determinação de elementos inorgânicos.....	15
TABELA 2. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ICP OES para determinação de elementos inorgânicos.....	20
TABELA 3. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ICP-MS para determinação de elementos inorgânicos.....	24
TABELA 4. Condições operacionais para a determinação de Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S, Zn e Mn por ICP OES.....	36
TABELA 5. Comprimentos de onda empregados para análise de Ca, Fe, K, Mg, S e Zn no músculo por ICP OES.....	36
TABELA 6. Condições operacionais para a determinação de Co, Cu, Cr, Mo, Se e V por ICP-MS.....	37
TABELA 7. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as determinações por ICP OES e ICP-MS respectivamente.	42
TABELA 8. Curvas analíticas dos analitos determinados por ICP OES e ICP-MS.....	43
TABELA 9. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de fígado bovino (NIST 1577c) determinados por ICP OES e ICP-MS.....	45
TABELA 10. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de músculo bovino (NIST 8414) determinados por ICP OES e ICP-MS.	46
TABELA 11. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de tomateiro (NIST 1573) determinados por ICP OES e ICP-MS.	47
TABELA 12. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de macieira (NIST 1515) Determinados por ICP OES e ICP-MS.....	48
TABELA 13. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de líquido ruminal determinadas por ICP OES.....	50
TABELA 14. Frações de massa dos micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de líquido ruminal determinadas por ICP-MS.....	54

TABELA 15. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de músculo determinadas por ICP OES.....	57
TABELA 16. Frações de massa dos micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de músculo determinadas por ICP-MS.....	59
TABELA 17. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de fezes determinadas por ICP OES.....	63
TABELA 18. Frações de massa dos micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de fezes determinadas por ICP-MS.....	65
TABELA 19. Valores de <i>scores</i> obtidos através da métrica <i>Gini impurity</i>	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Perfil da cadeia produtiva da pecuária de corte no Brasil em 2018. 2	
FIGURA 2. Esquema de uma árvore de decisão. ¹⁴⁴	29
FIGURA 3. Número de publicações de RF em 10 anos nas áreas de química. Tópico (palavra-chave): <i>Random Forest and Chemistry</i>	31
FIGURA 4. Gráfico de <i>score</i> LDA mostrando os agrupamentos do conteúdo de nutrientes inorgânicos para cada grupo.	66
FIGURA 5. Gráfico de <i>scores</i> da PC1 X PC2 - líquido ruminal.	67
FIGURA 6. Gráfico de <i>loadings</i> da PC1 X PC2 - líquido ruminal.	68
FIGURA 7. Gráfico de <i>scores</i> da PC1 X PC2 - músculo.	69
FIGURA 8. Gráfico de <i>loadings</i> da PC1 X PC2 – músculo.	69
FIGURA 9. Gráfico de <i>scores</i> da PC1 X PC2 - fezes.....	70
FIGURA 10. Gráfico de <i>loadings</i> da PC1 X PC2 – fezes.	71

RESUMO

ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM TECIDO, LÍQUIDO RUMINAL E FEZES DE BOVINOS DA RAÇA NELORE (*BOS TAURUS INDUCUS*)

Tendo em vista a importância dos constituintes inorgânicos para os bovinos e sua relação com a dieta fornecida aos animais, essa dissertação teve como objetivo propor um procedimento para a determinação multielementar dos analitos, Ca, Mg, P, K, S, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Co, Cr, Mo, Se e V, em amostras de líquido ruminal, músculo e fezes de bovinos submetidos a duas diferentes dietas. O experimento desenvolvido com 52 novilhos machos da raça Nelore teve como objetivo avaliar possíveis alterações em função das dietas, nos teores desses analitos nas diferentes amostras avaliadas. Os animais foram confinados e divididos em 2 grupos. O primeiro grupo foi submetido a uma dieta convencional (silagem de milho e farelo de soja) e o segundo a uma dieta com subprodutos (polpa cítrica e farelo de amendoim). Imediatamente após o abate, as amostras de líquido ruminal, músculo e fezes foram liofilizadas, moídas e em seguida submetidas à digestão assistida por radiação micro-ondas em meio a ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio. As determinações foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os métodos foram validados com o emprego de materiais de referência certificados (CRMs), sendo obtidos resultados satisfatórios para os CRMs avaliados e limites de detecção e quantificação adequados para o uso pretendido. Devido ao grande volume de resultados gerados, testes estatísticos foram realizados, a fim de verificar se havia diferença estatística entre as dietas. O teste *t* de Student foi aplicado quando a distribuição dos dados era normal e o teste de Mann-Whitney foi aplicado no caso de distribuição não normal. Os resultados indicaram diferenças significativas nas duas dietas avaliadas para Ca, P, Fe, Mn, Mg, Cr e V nas amostras de fezes e líquido ruminal. As amostras de fezes também

apresentaram diferenças significativas para Na, Zn, S, Cu e Co. Nas amostras de músculo foram observadas diferenças significativas apenas para o K. Análise discriminante linear (LDA) foi aplicada para verificar os agrupamentos de conteúdo mineral para cada grupo (líquido ruminal, músculo e fezes), sendo este teste capaz de discriminar os grupos com um score de 100%, indicando que os mesmos são muito bem definidos e distintos. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para verificar a dispersão das amostras e as tendências para grupos de tratamento (dieta convencional e dieta de subprodutos). Não foi possível observar uma separação clara entre os grupos de tratamento para as amostras de líquido ruminal e músculo. No entanto, para as fezes essa separação foi clara. Os dados gerados também foram analisados por modelos de florestas randômicas (RF) para verificar se a concentração dos analitos avaliados poderia ser utilizada como preditor do grupo de tratamento e verificar quais seriam os mais importantes para essa classificação. Os resultados obtidos pelo modelo RF indicaram que não é possível classificar as amostras utilizando os teores dos elementos inorgânicos do músculo e líquido ruminal. Porém, isso muda quando consideramos as fezes. Nesse caso, os dados de massa característica dos analitos formaram dois grupos distintos, com probabilidade de acerto pelo modelo de 100%.

ABSTRACT

EXPLORATORY ANALYSIS OF INORGANIC CONSTITUENTS IN TISSUE, RUMEN LIQUID AND FECES OF NELORE CATTLE (BOS TAURUS INDICUS)

Given the importance of inorganic constituents for cattle and their relation with the diet provided to animals, this dissertation aimed to propose a procedure for the multi-element determination of Ca, Mg, P, K, S, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Co, Cr, Mo, Se and V in samples of ruminal liquid, muscle and feces of cattle submitted to two different diets. The experiment developed out with 52 male Nellore steers aimed to evaluate possible changes depending on the diets, in the amount of the evaluated minerals in the different evaluated samples. The animals were confined and divided into 2 groups. The first one was submitted to a conventional diet (silage and soybean meal) and the other to a diet with by-products (citrus pulp and peanut meal). Immediately after slaughter, samples of ruminal liquid, muscle and feces were lyophilized, ground and then subjected to digestion assisted by microwave radiation in diluted nitric acid and hydrogen peroxide medium. The analytes were quantified by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The methods were validated with the use of certified reference materials (CRM), and satisfactory results were obtained. Limits of detection and quantification proved to be adequate for the intended use. Due to the large volume of results generated, statistical tests were performed to verify if there was a difference between the diets. The Student's t-test was applied when the data distribution was normal, and the Mann-Whitney test was applied in the case of non-normal distribution. The results indicated significant differences in the two diets evaluated for Ca, P, Fe, Mn, Mg, Cr, and V in the feces and ruminal liquid samples. Feces samples also showed significant differences for Na, Zn, S, Cu, and Co. In muscle samples, significant differences were observed only for K. Linear discriminant analysis (LDA) was applied to verify the groupings of mineral content for each group (ruminal liquid, muscle and feces).

This test was able to discriminate groups with a score of 100%, indicating that they are very well defined and distinct. Principal component analysis (PCA) was used to verify sample dispersion and trends for treatment groups (conventional diet and by-product diet). It was not possible to observe a clear separation between treatment groups for samples of ruminal liquid and muscle. However, for the feces, this separation was clear. The data generated were also analyzed by models of random forests (RF) to verify whether the concentration of the analyzed analytes could be used as a predictor of the treatment group and to verify which would be the most important for this classification. The results obtained by the RF model indicated that it is not possible to classify the samples using the contents of the inorganic elements of the muscle and rumen liquid. However, this changes when we consider feces, where the data of the characteristic mass of the analytes formed two distinct groups, with a probability of correctness by the model of 100%.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos.....	4
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	4
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. A raça Nelore no Brasil	6
2.2. Digestão de ruminantes	6
2.3. Função e determinação dos nutrientes inorgânicos	7
2.4 Procedimento de preparo de amostras	12
2.4.1 <i>Digestão assistida por radiação micro-ondas</i>	12
2.5. Técnicas analíticas empregadas na determinação de elementos inorgânicos	17
2.5.1 <i>Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)</i>	17
2.5.2 <i>Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)</i> . 22	
2.6. Análises estatísticas.....	26
2.6.1 <i>Análise discriminante linear</i>	26
2.6.2 <i>Análise de componentes principais</i>	27
2.6.3 <i>Floresta randômica</i>	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Amostras	34
3.2 Instrumentação	34
3.3 Reagentes e soluções padrão.....	37
3.4 Preparo de amostras	38
3.4.1 <i>Liofilização e moagem</i>	38
3.4.2 <i>Procedimento de digestão assistida por radiação micro-ondas</i>	38
3.5 Análise estatística	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1 Validação do método	41
4.1.1 <i>Limite de detecção e quantificação</i>	41
4.1.2 <i>Linearidade e faixa dinâmica linear</i>	42
4.1.3 <i>Exatidão</i>	43
4.2 Aplicação analítica	49
4.2.1 <i>Resultados para líquido ruminal</i>	49
4.2.2 <i>Resultados para músculo</i>	55
4.2.3 <i>Resultados das fezes</i>	60
4.3 Análise exploratória dos dados	66
4.3.1 <i>Análise discriminante linear</i>	66
4.3.2 <i>Análise de componentes principais</i>	67
4.3.3 <i>Florestas randômicas classificatórias</i>	71
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS	78

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A pecuária possui grande importância na economia brasileira e começou a ser desenvolvida no século XVI. A pecuária bovina, embora tenha tido crescimento considerável desde o período colonial, foi somente a partir da década de 60 que apresentou expansão digna de nota, devido principalmente a introdução de novas raças, resultado da política de governo para esse setor, além de melhorias nas técnicas de criação.¹ Hoje o Brasil é o segundo maior produtor de gado de corte do mundo, com um rebanho aproximado de mais de 210 milhões de cabeças de gado, ocupando mais de 160 milhões de hectares de pastagem.^{2,3} Desde 2004, o Brasil assumiu a liderança nas exportações, com 23,6% da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 150 países.⁴

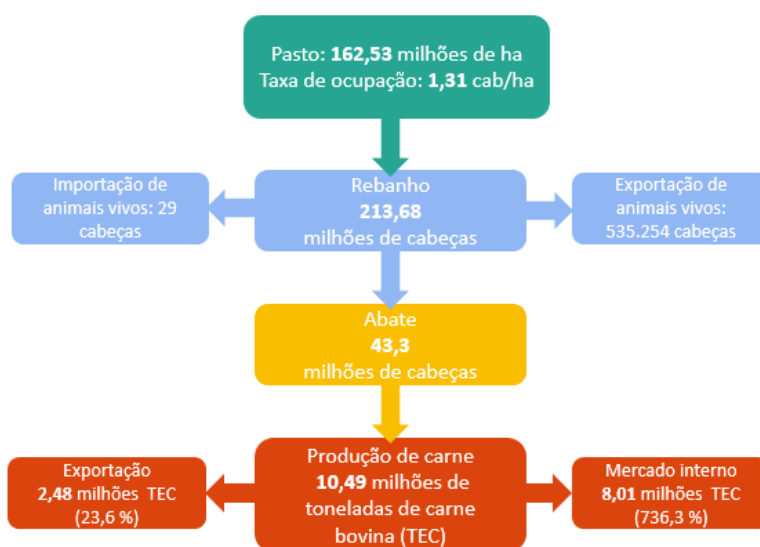


Figura 1. Perfil da cadeia produtiva da pecuária de corte no Brasil em 2019.

Fonte: Adaptado da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (2019).

Em 2019 o valor movimentado pela pecuária de corte atingiu R\$ 618,50 bilhões, 3,5% acima dos R\$ 597,22 bilhões registrados em 2018. Com isso, o PIB da pecuária elevou para 8,5% sua participação no PIB total brasileiro.⁴ Estudos mostram que esse setor deve apresentar crescimento nos próximos anos, e a

expectativa é que a produção de carne no Brasil continue seu rápido crescimento na próxima década. Em 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial.⁵

O gado de corte requer um alto consumo de compostos inorgânicos para a manutenção da sua saúde, produção e reprodução. Esses compostos estão envolvidos praticamente em todas as vias metabólicas do organismo animal, com importantes funções no desenvolvimento reprodutivo, na manutenção do crescimento, no metabolismo energético, na função imune, entre outras tantas funções fisiológicas, não só para manutenção da vida, como também para o aumento da produtividade animal.⁶

A necessidade dos nutrientes inorgânicos no organismo bovino varia de acordo com o estado fisiológico, sanitário e reprodutivo do animal,⁶ assim como em função da forma como esses analitos serão absorvidos no intestino e usados pelas células e tecidos, isto é, sua biodisponibilidade, dependendo das interações orgânicas e inorgânicas entre os componentes da dieta.⁷ Dietas que não fornecem quantidades adequadas de nutrientes podem levar a problemas de saúde animal e a perdas de lucratividade para os produtores. A produção eficiente desses animais requer que os nutrientes essenciais de uma dieta sejam fornecidos em quantidades apropriadas e nas formas mais úteis biologicamente.^{8,9}

Considerando esses fatores, a quantificação dos teores de constituintes inorgânicos normalmente é requerida, sendo para tanto utilizadas técnicas espectroscópicas que exigem que as amostras estejam na forma líquida. Dessa forma, o preparo das amostras é necessário, constituindo-se na etapa determinante e que apresenta inúmeros desafios quanto a sua eficiência.

Dentro desse contexto, essa dissertação de mestrado propõe o desenvolvimento de um procedimento para o preparo de amostras de tecidos, fezes e líquido ruminal em bovinos visando a determinação do teor de nutrientes minerais, cujos resultados serão inseridos em banco de dados fenotípicos a ser utilizado em experimentos metagenômicos.

1.1 Objetivos

1.1.1 *Objetivo geral*

Gerar dados de constituintes inorgânicos nos tecidos, líquido ruminal e fezes de 52 bovinos da raça Nelore que foram submetidos a dois diferentes tipos de dietas; uma com alto teor de grãos (silagem de milho e farelo de soja), e outra com substituição total do milho e do farelo de soja por subprodutos (polpa cítrica e farelo de amendoim), para subsidiar a obtenção de respostas com o emprego de ferramentas da bioinformática referentes à interação entre os nutrientes e os microbiomas encontrados nos organismos de animais ruminantes.

1.1.2 *Objetivos específicos*

- i. Desenvolver procedimento para o preparo de amostras de músculo, líquido ruminal e fezes de bovinos visando a determinação de macro e micronutrientes;
- ii. Contribuir para a minimização do uso de reagentes, empregando os princípios da química verde.
- iii. Realizar análises de macro e micronutrientes em amostras de músculo, líquido ruminal e fezes dos 52 bovinos submetidos as diferentes dietas;
- iv. Montar e disponibilizar banco de dados com as informações obtidas.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A raça Nelore no Brasil

O nelore é uma raça de origem do boi Ongole da Índia. Essa raça começou a chegar ao Brasil na primeira metade do século XIX e rapidamente se tornou predominante no rebanho brasileiro.¹⁰ Hoje, estima-se que o Nelore representa 80% de toda a produção de carne do território brasileiro.²

A raça Nelore se adaptou muito bem às condições tropicais brasileiras por possuir excelente capacidade de aproveitar alimentos rústicos. Outra característica que fez com que a raça se adaptasse muito bem ao clima brasileiro é a sua resistência natural a parasitas. Esses animais possuem pelos mais grossos que impedem ou dificultam o alojamento de pequenos insetos na superfície da pele. Além disso, o Nelore é muito resistente ao calor podendo ser criado tranquilamente em regiões mais quentes, como no nordeste brasileiro.¹⁰

Essa raça passou por intenso melhoramento genético no Brasil, melhoramento esse voltado quase que exclusivamente à produção de carne. O Nelore brasileiro, além de ser considerado hoje como um patrimônio legitimamente nacional, produz carne saudável e natural, exportada para mais de 180 países e cada vez mais demandada por consumidores do mundo todo.⁴ Conforme um relatório da World Resources Institute (WRI), até 2050 o mundo terá que dobrar sua produção de carne para suprir a alta demanda e sem dúvida o Nelore está incluído nas raças que irão continuar a aumentar de tamanho e qualidade.¹¹

2.2. Digestão de ruminantes

Os ruminantes são mamíferos herbívoros que possuem vários compartimentos gástricos. O que os diferencia dos demais animais é a capacidade de regurgitar os alimentos para mastigação, que aumenta a eficiência de digestão e consequentemente aumenta a absorção dos nutrientes essenciais.^{12,13}

O processo digestivo dos ruminantes é bastante complexo e envolve diversas etapas. Além disso, o estômago de ruminantes pode ser dividido em quatro partes, sendo essas: o retículo, o rúmen e o omaso, que fazem parte do pré-

estômago, onde ocorrem os processos fermentativos dos micro-organismos presentes e torna possível o metabolismo das fibras; e o abomaso, onde a digestão é feita pelo suco gástrico.¹⁴

O rúmen é o maior compartimento do estômago de um ruminante, responsável pela fermentação anaeróbica e possui um número expressivo de bactérias (10^9 a 10^{11}), fungos (10^3 a 10^5) e protozoários (10^4 a 10^7), os quais são responsáveis pela hidrólise de lipídios, proteínas e carboidratos (incluindo a celulose).^{15,16} Todos esses micro-organismos encontrados no rúmen e no intestino compõem o microbioma, que por apresentar uma grande variedade de micro-organismos, apresenta-se como potencial fonte de transformação e interação entre os constituintes inorgânicos, as proteínas e o hospedeiro, cujos mecanismos podem ser elucidados através de uma avaliação da metagenômica.¹⁶

Devido ao fato de o estômago ser dividido em quatro partes e da relação simbiótica que desenvolveu com microrganismos fermentadores de fibra, os ruminantes possuem a capacidade de aproveitarem, de forma eficiente, carboidratos fibrosos como fonte de energia e compostos nitrogenados não proteicos como fonte de proteína.¹⁴

2.3. Função e determinação dos nutrientes inorgânicos

O gado de corte requer um alto consumo de compostos inorgânicos para a manutenção da sua saúde, produção e reprodução. Alguns desses analitos são considerados essenciais, como é o caso dos macronutrientes: cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg), fósforo (P), sódio (Na) e enxofre (S), encontrados em altas concentrações, na ordem de porcentagem ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra), e dos micronutrientes: crômio (Cr), ferro(Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co), manganês (Mn), molibdênio (Mo), selênio (Se) e níquel (Ni), encontrados em concentrações da ordem de partes por milhão ($\text{mg } \text{g}^{-1}$). Enquanto outros são considerados não-essenciais e podem inclusive ser considerados tóxicos, a depender do seu estado de oxidação, concentração ou espécie, tais como o arsênio (As), mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e chumbo (Pb).^{17,18}

Dentre os nutrientes essenciais, serão discutidas as funções metabólicas do Ca, K, Mg, P, Na, S, Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Cr e Co e as causas das suas deficiências e/ou excesso no organismo do animal.

O Ca é o constituinte inorgânico mais abundante no organismo dos bovinos, e tem como funções a mineralização óssea, regulação metabólica, contração muscular, coagulação sanguínea e transmissão de impulsos nervosos. A interação do Ca com outros nutrientes sugere que tanto a sua deficiência como o seu excesso devem ser evitados. Sua deficiência causa doenças como raquitismos, abortos, osteomalácia e baixa produção de leite.¹⁹

O K é o terceiro elemento mais abundante nos tecidos animais, ele está ligado à regulação da pressão osmótica, regulação do equilíbrio ácido-base, transmissão de impulso nervoso, contração muscular, controle do equilíbrio hídrico e, juntamente com o Na, ajuda a manter o equilíbrio adequado de fluidos nas células. Sua deficiência é rara e os sintomas de sua deficiência não são muitos específicos.²⁰

Tizioto et al.²⁰ compararam os teores de Ca e K na carne bovina com marcadores moleculares e verificaram que a disponibilidade reduzida de Ca pode afetar o sistema calpaína-calpastatina, que desempenha um papel importante na proteólise *post-mortem* e no amaciamento da carne, além de ser crucial para a contração muscular. O estudo também mostrou que o K afeta positivamente a força de cisalhamento Warner-Bratzler (WBSF), o que significa que níveis mais altos de K estão relacionados à menor maciez da carne. Nesta mesma linha de pesquisa, Baldassini e colaboradores,²¹ estudaram as metaloproteínas em músculo bovino e indicaram a relação positiva entre o cálcio e a maciez da carne bovina.

O Mg é cofator de mais de 300 enzimas, está envolvido no metabolismo de carboidratos e lipídeos, é componente de ossos e regulador da atividade neuro-muscular. Desempenha papel essencial na respiração celular, função celular, sistema de transporte ativo e sistema nervoso. Dietas deficientes em Mg podem causar redução na digestibilidade dos nutrientes que traduzem uma diminuição do desempenho animal.^{19,22}

O P é o nutriente inorgânico que tem mais funções no corpo em relação a todos os outros. Faz parte de uma gama de reações metabólicas produtoras de energia para o animal e para as bactérias do rúmen. Além de ser um constituinte do esqueleto, o P é encontrado no nucleotídeo, na forma de ATP, ácido nucleico, fosfolípídeo e compostos fosforilados essenciais para o metabolismo do animal. É também importante na transmissão do código genético. Sua deficiência leva a infertilidade ou diminuição do desempenho reprodutivo do animal.^{8,22}

O S é formador de diversos aminoácidos, além das pontes de dissulfeto, responsáveis pela construção das estruturas terciárias que levam a formação das proteínas. Está presente na digestão da celulose, assimilação do N não-proteico e síntese de vitaminas do complexo B (tiamina e biotina). Enxofre insuficiente na dieta provoca a redução na ingestão de alimentos, menor digestibilidade e diminuição na produção de leite. No entanto, níveis de enxofre que excedem a exigência podem diminuir a ingestão de alimentos e pode sobrecarregar o sistema de excreção urinário.²²

O Na por sua vez, atua em conjunto com o K na regulação da pressão osmótica, equilíbrio fluídico e equilíbrio ácido-base nos tecidos corporais. Sua deficiência pode causar perda de peso, inapetência, aumento do consumo de água e redução na produção de leite. Com adequada suplementação de sal, os bovinos podem recuperar-se completamente e rapidamente.²³

O Fe desempenha um papel central em várias funções bioquímicas, atuando como cofator enzimático e/ou componente proteico estrutural. É diretamente responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio e transporte de elétrons, além de ser componente de enzimas, como catalases, peroxidases, ribonucleotídeo, redutase e aconitase, que são fundamentais para as funções fisiológicas.²⁴ Assim como outros nutrientes, o Fe participa da síntese e metabolismo de vários hormônios que, por interações complexas, estão envolvidos no metabolismo, crescimento e desenvolvimento dos animais.²⁵ A deficiência de ferro causa anemia e sua intoxicação é caracterizada por diarreia, redução na ingestão de alimentos e ganho de peso diário.

Diniz e colaboradores²⁴ avaliaram os genes expressos relacionados à variações dos teores de Fe em amostra de músculo bovino e estabeleceram a correlação desses genes expressos com os parâmetros de qualidade da carne.

O Zn é componente integral de mais de 300 enzimas.⁶ Está relacionado à expressão gênica e à estabilidade de membranas,¹⁹ além de estar envolvido nos processos catalíticos, estruturais e reguladores da queratinização através do seu papel nas metaloenzimas. Outro papel importante do Zn inclui a integridade estrutural dos tecidos. A deficiência de Zn é caracterizada pela diminuição no ganho de peso, consumo e eficiência alimentar.⁶

O Mn, apesar de ser considerado um elemento essencial para ruminantes e estar associado à sua formação óssea, é encontrado em baixas concentrações. É importante na síntese do colesterol, que por sua vez é necessário para a síntese de esteroides como progesterona, estrogênio e testosterona. A deficiência do manganês leva ao crescimento retardado, anormalidades ósseas e distúrbios ou paralisação reprodutiva. A toxidez nos ruminantes é improvável de acontecer.²⁶

O Cu é essencial para a atividade de numerosas metaloenzimas cujo déficits funcionais dão origem a várias patologias. Também é essencial para inúmeros cofatores e proteínas reativas, um exemplo, são as proteínas envolvidas no sangue que ajudam na saúde e no crescimento do animal.⁸ A deficiência de Cu é um problema sério para a pastagem de ruminantes em muitos países. Isso se deve tanto as baixas concentrações do elemento na forragem, quanto a quantidades elevadas de Mo e S, que reduzem a biodisponibilidade do Cu. Sua deficiência causa redução do crescimento ou perda de peso e redução da produção de leite.²³

O Se que já foi reconhecido como um elemento tóxico para bovinos, sendo atualmente considerado um elemento essencial para a resposta imune ideal. Influencia o sistema imunológico através de um papel fundamental na regulação redox e na função antioxidante, além de contribuir para a integridade da membrana e proteção contra danos no DNA. A deficiência de Se nos animais ocorre com mais frequência do que a intoxicação.²⁷

Embora o papel principal do Cr esteja relacionado à sua capacidade de aumentar a ação da insulina, estudos indicaram que a suplementação de Cr pode afetar a saúde e a resposta imune em ruminantes.²⁸ Outros estudos também indicaram que a suplementação de Cr pode afetar significativamente a ingestão de alimentos e a produção de leite em vacas leiteiras.^{29,30}

O Co é um dos componentes da vitamina B12. Quando adicionado à dieta os microrganismos presentes no rúmen sintetizam facilmente essa vitamina. Os sinais de deficiência de Co são falhas no crescimento, degeneração do fígado, problemas imunológicos e perda de peso.⁸

Domaradzki et al.³¹ determinaram os teores de macro e micronutrientes no músculo de touros jovens de cinco raças e compararam os resultados. Observaram que a raça afeta os teores de K, Na, Mg, Ca, Zn, Mn e Cu na carne. A carne de touros jovens da raça *Polish Holstein-Friesian* (PHF) continha menores teores de macronutrientes (K, Mg e Ca) e maiores teores de micronutrientes (Zn, Fe e Mn) em comparação com as outras quatro raças avaliadas pelo estudo. O mesmo foi observado por Pilarczyk³², que analisou os teores dos principais elementos nutricionais (Ca, P, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Co, Cr, Ni, Sr e Ba), bem como elementos potencialmente tóxicos (Cd e Pb) no músculo *longissimus* de touros Charolês, Hereford e Simental e verificou que os teores de K, Mg, Zn, Mn, Fe e Cu presentes na carne diferiam em razão da raça do animal.

Rodríguez-Marín et al.³³ analisaram os níveis de elementos potencialmente tóxicos (Al, Cd e Pb) e traços (B, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr e Zn) no músculo e fígado de novilhos (*Bos taurus*) de origem estrangeira e local (Ilhas Canárias, Espanha), com o objetivo de avaliar o risco de consumo para os consumidores. De acordo com os resultados obtidos, o músculo e o fígado de novilhos constituem uma fonte alimentar de nutrientes inorgânicos, principalmente Zn e Fe. Além disso, a presença de Al, Cd e Pb não representa um risco toxicológico para a população quando o consumo de carne bovina é moderado.

Ambushe et al.³⁴ avaliaram os níveis de V, Cr, Mn, Sr, Cd, Pb e U nos órgãos e tecidos de bovinos obtidos em áreas poluídas da Província Noroeste da África do Sul. O estudo revelou um acúmulo de Sr nos ossos, Cd, Pb e U nos rins e ossos, Mn no fígado e V e Cr nos tecidos renais desses bovinos. Com isso, a carne

de animais que pastam em áreas poluídas com elementos potencialmente tóxicos pode ser segura para o consumo humano, desde que o fígado, rim e ossos sejam descartados, tecidos onde aparentemente ocorre a bioacumulação desses analitos.

2.4 Procedimento de preparo de amostras

2.4.1. Digestão assistida por radiação micro-ondas

A decomposição da amostra visa a remoção da matéria orgânica presente e a solubilização dos analitos. Nessa etapa, a amostra é oxidada na presença de um ácido inorgânico com alto poder oxidante, como o ácido nítrico (HNO_3), para geração de espécies solúveis em água (os nitratos). O emprego de um agente oxidante complementar, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode potencializar a oxidação.³⁵

A digestão assistida por radiação micro-ondas é o estado da arte do preparo de amostras, pois apresenta distribuição homogênea de calor nos frascos contendo a amostra e a solução ácida, em um sistema de alta pressão e temperatura.³⁶ Este método envolve a decomposição total ou parcial da amostra, destruindo a maior parte da matéria orgânica. Pode ser realizado em sistema aberto ou fechado, sendo a digestão assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado a mais utilizada para digestão de amostras, especialmente amostras que contém grandes quantidades de compostos orgânicos.³⁵

Métodos baseados na digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado são amplamente relatados na literatura devido às suas diversas vantagens, como: maior eficiência na decomposição, menor tempo de aquecimento, redução de contaminação cruzada, redução da perda de analitos voláteis, menor consumo de reagentes e controle preciso da temperatura, pressão e tempo.^{35,37,38,39,40,41}

No entanto, o simples emprego de um sistema de digestão fechado não fornecerá resultados precisos, muitas variáveis podem causar uma decomposição ineficiente, entre as quais o emprego de programa de aquecimento não adequado e volume e/ou concentração ácida baixos em amostra de difícil decomposição.^{42,43} Além disso, existe uma limitação relacionada à massa de

amostra que pode ser digerida com base na pressão máxima que um vaso fechado normalmente pode suportar, em comparação com as massas digeridas em sistemas abertos.^{44,45}

Atualmente, uma das tendências mais importantes no preparo de amostras é a busca de procedimentos ambientalmente amigáveis.^{46,47,48,49} A possibilidade de reduzir a quantidade de reagente e o uso de soluções ácidas diluídas é atraente do ponto de vista da minimização de resíduos, redução de custos, diminuição dos valores em branco e geração de soluções digestoras mais adequadas à introdução por nebulização, que permitem a redução de interferências nas técnicas espectrométricas causadas pela acidez excessiva dos digeridos.^{42,48}

Diferentes ácidos podem ser utilizados para a digestão de amostras, no entanto, o HNO_3 é o mais empregado devido a sua facilidade de manipulação e purificação e pela capacidade oxidativa de compostos orgânicos em diferentes amostras.^{42,50,51}

Várias aplicações recentes demonstraram o potencial de soluções diluídas de HNO_3 na digestão assistida por radiação micro-ondas.^{49,52,53,54} A eficiência do HNO_3 diluído na oxidação da matéria orgânica pode ser explicada pela regeneração do mesmo, promovida pela combinação das espécies de óxido de nitrogênio com o oxigênio presente no interior do vaso de reação.⁵⁵ Procedimentos que utilizam um baixo volume de ácidos ou soluções ácidas diluídas empregam um agente oxidante complementar, como o H_2O_2 para potencializar a oxidação.³⁵ A presença do H_2O_2 causa um aumento da pressão, levando a uma eficiente oxidação da matéria orgânica a temperaturas mais baixas.⁴² No entanto, essa abordagem pode ser limitada devido à perda de eficiência na decomposição de matrizes complexas.⁵⁶

Visando eliminar essas limitações e reduzir ao máximo a quantidade de HNO_3 necessária ao processo de digestão, Bizzi et al.^{57,58} exploraram a digestão de amostras com radiação micro-ondas com o uso de vasos pressurizados com oxigênio (O_2). Sob essa condição, o O_2 atua como um reagente auxiliar para promover a regeneração do HNO_3 , melhorando a eficiência da oxidação de compostos orgânicos. Foi demonstrado que a combinação da solução diluída de

HNO₃ com a pressurização do oxigênio permite realizar digestões eficientes com soluções diluídas em até 0,5 mol L⁻¹ de HNO₃. A eficiência do processo de digestão foi verificada através da medição dos teores residuais de carbono e acidez residual nos digeridos, sendo demonstrado que ambos os parâmetros eram totalmente compatíveis com os requisitos da análise instrumental moderna, sem qualquer diluição adicional dos digeridos.^{55,56,57,58,59}

Na Tabela 1 estão resumidos alguns trabalhos encontrados na literatura que empregaram a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado e ácidos diluídos no desenvolvimento de métodos para a determinação de elementos inorgânicos em diferentes matrizes.

Tabela 1. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado no desenvolvimento de métodos de preparo para determinação de elementos inorgânicos.

Amostras	Mistura digestora	Técnica de determinação	Informações adicionais	Referência
Farinha de mandioca, de milho e de trigo	HNO_3 65% (m v^{-1}) + H_2O_2 30% (m v^{-1})	ICP OES e ICP-MS	Diferentes concentrações de HNO_3 e H_2O_2 foram avaliadas	60
Folha de maçã, fígado bovino e MRC de leite em pó	6 mL de HNO_3 2 mol L^{-1}	ICP OES	Os vasos foram pressurizados com 7,5 bar de O_2 . A influência do fluxo de ar no resfriamento dos vasos durante a digestão foi avaliada	56
Arroz	7 mL de HNO_3 4,5 mol L^{-1} + 1 mL H_2O_2 30% (m v^{-1})	ICP OES e ICP-MS	Diferentes concentrações do HNO_3 (2,0, 4,5 e 7,0 mol L^{-1}) foram avaliadas	61
Produtos comestíveis a base de soja	HNO_3 2 mol L^{-1} + 1 mL H_2O_2 30% (m v^{-1})	ICP OES e ICP-MS	Diferentes concentrações de HNO_3 e o uso do H_2O_2 foram avaliados	49
Leite em pó	8 mL H_2O_2 30% (m v^{-1})	ICP OES e ICP-MS	As digestões foram feitas no sistema de câmara de reação única. Diferentes volumes de H_2O_2 foram testados	62
Chás de ervas	6 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} + 2 mL H_2O_2 30% (m v^{-1})	ICP-MS	O procedimento de preparo das amostras com diluição ácida também foi avaliado	63

Tabela 1. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado no desenvolvimento de métodos de preparo para determinação de elementos inorgânicos (continuação).

Amostras	Mistura digestora	Técnica de determinação	Informações adicionais	Referência
Erva Mate	6 mL de HNO ₃ 4,5 mol L ⁻¹	ICP-MS	Os vasos foram pressurizados com 8 bar de O ₂ . Diferentes concentrações do HNO ₃ foram avaliadas	64
Leite comercial e produtos à base de leite	1 mL de HNO ₃ 65% (v v ⁻¹) + 1 mL de H ₂ O ₂ 35% (m v ⁻¹)	ICP OES	Os procedimentos de digestão a seco e digestão úmida também foram avaliados	38
Farinha de trigo, pão integral, dieta total e leite em pó desnatado	10 mL da mistura 2% (v v ⁻¹) de HClO ₄ e 4% (v v ⁻¹) de H ₂ O ₂	ICP OES	Diferentes concentrações do HClO ₄ e do H ₂ O ₂ foram avaliadas	37
Guaraná	1 mL de HNO ₃ 9 mol L ⁻¹ + 3 mL de H ₂ O ₂ 30% (m v ⁻¹) + 6 mL de H ₂ O	ICP OES	Diferentes misturas foram avaliadas	65
Cacau em pó e chocolate	3 mL de HNO ₃ 65% (v v ⁻¹) + 5 mL de H ₂ O	ICP-MS	-	66
Mel, farinha de trigo, de milho, de mandioca e de batata	8 mL de H ₂ O ₂ 50% (m v ⁻¹)	ICP OES e ICP-MS	As digestões foram realizadas no sistema de câmara de reação única.	67

2.5. Técnicas analíticas empregadas na determinação de elementos inorgânicos

2.5.1. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

Em 1964 e 1965, Greenfield e Fassel propuseram o uso de plasmas para fins analíticos. Ao longo de uma década essa nova técnica, que utilizava uma fonte de plasma para produzir espectros de emissão a partir da excitação e decaimento de átomos e íons de interesse tornou-se gradativamente atraente para a comunidade científica da área, quando em 1975 foi introduzido no mercado o primeiro espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.⁶⁸ Desde então, a técnica se desenvolveu e se transformou numa poderosa ferramenta analítica amplamente empregada em análises de rotina para determinação de metais, semimetais e não metais em diversos tipos de amostras.⁶⁹

Na espectrometria de emissão óptica (OES) as informações analíticas são geradas a partir do espectro eletromagnético com radiações nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo. O espectro eletromagnético é gerado a partir das transições eletrônicas que ocorrem na camada externa de átomos e íons excitados.⁶⁹ Inicialmente, os átomos apresentam seus elétrons nos níveis fundamentais de energia. A aplicação de uma fonte de energia externa, excita esses elétrons para um nível de energia mais alto. Após um curto intervalo de tempo, esses elétrons sofrem uma relaxação para um nível mais baixo de energia emitindo energia na forma de fótons com energia e comprimentos de onda específicos. A radiação emitida é então direcionada ao sistema de seleção de comprimentos de onda e, em seguida, ao detector. A intensidade de emissão é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra.⁷⁰

Os espectrômetros de emissão óptica com plasma induzido são compostos basicamente por um sistema de introdução de amostras, comumente formado pelo conjunto nebulizador, câmara de nebulização e tocha de quartzo para geração do plasma, fonte de radiofrequência, sistema óptico para permitir a eficiente separação dos diferentes comprimentos de onda e o

sistema de detecção.⁶⁹ O plasma de argônio é reconhecidamente a fonte de excitação mais utilizada para análises multielementares, pois possui energia suficiente para atomizar a maioria dos elementos, proporcionando alta sensibilidade com ampla faixa linear de trabalho e estabilidade temporal satisfatória.^{69,71}

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma das técnicas analíticas mais úteis empregada para análise multielementar em diversos tipos de amostras. Isso ocorre em função de suas principais características, como: boa sensibilidade, que permite limites de detecção relativamente baixos, capacidade para determinações simultâneas, rápidas e precisas em amplas faixas de concentração e robustez.⁷² No entanto, assim como ocorre em outras técnicas analíticas, esta é amplamente susceptível a interferências de matriz e variações nas condições instrumentais, que prejudicam a qualidade dos resultados. Além disso, para as análises por ICP-OES é necessário que a amostra esteja na forma líquida ou solubilizada em um solvente adequado; no caso de amostras sólidas, um método de preparo que seja capaz de converter a amostra em uma solução aquosa adequada para ser introduzida no espectrômetro é essencial.^{71,73}

Nesse contexto, diferentes estratégias foram desenvolvidas para melhorar a precisão e minimizar os efeitos de matriz nas análises por ICP OES, desde estratégias comuns, como diluição de amostra, padronização interna (IS), adição de padrão (SA), até estratégias recentemente propostas, como a calibração por múltiplas energias (MEC), a análise por adição de padrão interno (SDA) e a calibração de fluxo múltiplo (MFC).^{72,74,75,76,77}

Além disso, esforços contínuos estão sendo feitos para desenvolver novas configurações instrumentais, com o objetivo de melhorar as características dos equipamentos. Os equipamentos de ICP OES do início dos anos 1970 por exemplo, possuíam uma configuração radial e após alguns anos foi introduzida a configuração axial. A configuração radial utilizava uma fonte de plasma vertical, o que diminuía consideravelmente a área de observação, já a configuração axial utilizava um plasma horizontal, o que aumentava a área de observação e conseqüentemente a sensibilidade. Após o início dos anos 90,

foi incorporado ao ICP OES um sistema óptico de alta resolução, equipado com grade de proteção e dispositivo de carga acoplada (CCD), que melhorou as medições de várias linhas espectrais e permitiu determinações rápidas de múltiplos comprimentos de onda.^{77,78}

Recentemente, a Agilent Technologies lançou um novo ICP OES com um arranjo óptico que permite três modos de visão, as visões axial e radial já conhecidas e a nova visão dupla vertical síncrona (SVDV). Ao contrário do ICP OES de visão dupla convencional, o arranjo SVDV permite a visualização axial e radial de forma simultânea, devido ao uso da tecnologia combinador espectral dicróico (DSC). O DSC permite que a luz das visões axial e radial do plasma seja medida ao mesmo tempo. Com isso, as medidas de ambas as configurações de visualização são alcançadas com apenas uma leitura. Esse equipamento apresenta como vantagem maiores rendimentos de amostra e conseqüentemente, redução no consumo de argônio, além de permitir medições precisas para amostras com grande variedade de concentração ou solventes orgânicos voláteis.^{72,77,79,80}

Na Tabela 2 são apresentados alguns exemplos de trabalhos que empregaram ICP OES para a determinação de elementos inorgânicos em diferentes tipos amostras.

Tabela 2. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ICP OES para determinação de elementos inorgânicos.

Amostra	Analito	Preparo de amostra	Informações adicionais	Referência
Pimenta	Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn	Extração assistida por ultrassom	Digestão assistida por micro-ondas foi usada como método de referência	81
Carne	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn	Digestão ácida assistida por radiação MW	Mistura ácida: HNO ₃ + H ₂ O + H ₂ O ₂	82
Arroz	Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mo e Ni	Digestão ácida assistida por radiação MW	Mistura ácida: HNO ₃ + H ₂ O ₂	83
Água	As, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se e U	-	Análise no modo SVDV	79
Amostras geológicas e agrícolas	Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Th, Tm, Y e Yb	Digestão ácida assistida por radiação MW	Mistura ácida: Água régia, para amostras geológicas e HNO ₃ + H ₂ O ₂ para amostras agrícolas	84
Frutas processadas	Cd, Hg, Sn, Al, Pb e As	Digestão ácida assistida por radiação MW	Mistura ácida: HNO ₃ + H ₂ O ₂	85
Fertilizantes minerais	As, Cd e Pb	Digestão ácida assistida por radiação MW	Mistura ácida: HNO ₃ + H ₂ O ₂ ; utiliza Bi, Ir, Sc e Y como padrão interno, modo SVDV	72
Couro	Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn, As, Sb, Ti, Zr, Mo e V	Digestão ácida assistida por radiação MW	Mistura ácida: HNO ₃ + H ₂ O ₂ ; análise na visão axial e calibração por padronização interna	86

Tabela 2. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ICP OES para determinação de elementos inorgânicos (continuação).

Amostra	Analito	Preparo de amostra	Informações adicionais	Referência
Água de lago, salina e da torneira	Pd e Pt	Extração em ponto nuvem	Solução de ponto nuvem: Triton X-114 + 2-MBT + SnCl ₂ ou KI	87
Óleo de farelo de arroz	As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn	Digestão ácida assistida por radiação MW	Mistura ácida: HNO ₃ + H ₂ O ₂	88
Alimentos e água	Sb, Sn e Tl	Digestão ácida em bloco digestor (alimentos)	Extração em ponto nuvem assistida por ultrassom para pré-concentração dos elementos	89
Fertilizantes	As, Hg, Sb e Se	Digestão ácida assistida por radiação MW e extração assistida por ultrassom	Mistura ácida: Água régia; faz uso da geração de vapor químico	90
Petróleo bruto	Ni, V, Fe e Ca	Diluição em o-xileno	Os analitos também foram determinados por ICP-MS	91
Água e alimentos	As, Cd, Cr, Co, Sb, Pb e Tl	Extração em ponto nuvem assistida por ultrassom + extração dispersa em fase sólida μ	-	92
Frutas enlatadas	Cr, Cd, Cb e Sn	Digestão ácida em placa de aquecimento	Mistura ácida: HNO ₃ + HCl; os analitos também foram determinados por ICP-MS	93

2.5.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é uma técnica instrumental que se baseia na formação de íons positivos a partir das elevadas temperaturas do plasma de argônio. As amostras líquidas são nebulizadas primeiro no sistema de introdução de amostras, criando um aerossol fino que é posteriormente transferido para o plasma de argônio. O plasma de alta temperatura atomiza e ioniza a amostra gerando íons, e esses íons são direcionados para o espectrômetro de massas através de uma interface e separados pela ação um campo eletromagnético em função da razão massa/carga (m/z).⁹⁴

De forma geral o ICP-MS é composto por um sistema de introdução de amostra que inclui um nebulizador, uma câmara de nebulização e um tubo de quartzo; uma interface que une o ICP ao MS; um sistema de focalização de íons positivos e de separação de massas e um detector. O argônio é o gás mais utilizado para geração e manutenção do plasma, bem como para o transporte de íons, pois possui energia suficiente para ionizar quase todos os elementos da tabela periódica, incluindo os elementos de difícil ionização.⁹⁵

Atualmente, a ICP-MS pode ser vista como uma das principais técnicas aplicada à química analítica. Essa técnica teve grande aceitação do mercado devido à sua capacidade de análise multielementar (sequencial), medidas da razão isotópica, baixos limites de detecção, ampla faixa linear, elevada frequência analítica, alta eficiência e por gerar espectros de massas simples e de fácil interpretação.^{96,97}

No entanto, desde a sua introdução no final dos anos 80 a técnica também é caracterizada por algumas desvantagens que comprometem a sua sensibilidade e precisão na determinação de alguns elementos, como: as interferências físicas, matriciais e espectrais. A fonte de interferência pode vir da matriz da amostra, dos reagentes utilizados na etapa de preparo da amostra, do gás do plasma, entre outras fontes, o que torna o problema mais complexo.⁹⁶

As interferências físicas ocorrem quando há acúmulo de sólidos nos orifícios dos cones da interface, ocasionando uma diminuição no sinal devido a

problemas durante o transporte dos íons. As interferências matriciais são mais complexas e causadas por componentes da matriz que contem a amostra. Essa interferência leva a dois tipos de efeitos, o efeito de carga espacial e o efeito de transporte de amostra. As interferências espectrais são originadas a partir de íons atômicos e moleculares que apresentam a mesma razão m/z do analito de interesse, resultando em um aumento errôneo de sinal. Esse tipo de interferência pode acontecer por sobreposição isobárica; produção de óxidos, hidróxidos e hidretos; formação de íons poliatômicos e de íons de dupla carga.^{95,98,99}

Ao longo dos anos várias estratégias têm sido propostas para minimizar ou eliminar essas interferências, tais como: diluições das soluções, subtração em branco (com correspondência de matriz), uso de padrão interno, condições de plasma frio, além de estratégias instrumentais como a tecnologia de celas de colisão (CCT), cela dinâmica de reação (DRC) e interface de reação-colisão (CRI) que se fundamentam na introdução de gases reativos (H_2 , NH_3 , CH_4 e O_2) ou inertes (He) as celas de reação e/ou colisão que antecedem o detector.^{100,101,102,103,104,105}

Na Tabela 3 estão resumidos alguns trabalhos encontrados na literatura utilizando ICP-MS para determinação de elementos inorgânicos em diferentes matrizes.

Tabela 3. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ICP-MS para determinação de elementos inorgânicos.

Amostra	Preparo de amostra	Analito e isótopo	Íon monitorado	Referência
Especiarias e ervas aromáticas	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas	Na(23), Mg (24), K (39), Ca(44), Cr (52), Mn (55), Fe(56), Co (59), Ni (60), Cu (63), Zn (66), As (75), Se(78), Cd (111), Hg(202) e Pb (208)	Na ⁺ , Mg ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺ , Cr ⁺ , Mn ⁺ , Fe ⁺ , Co ⁺ , Ni ⁺ , Cu ⁺ , Zn ⁺ , As ⁺ , Se ⁺ , Cd ⁺ , Hg ⁺ e Pb ⁺	106
Plantas medicinais asiáticas	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas	Cd (114), Sb (121), Pb (208), Al (27), As (75), Ni (60) e Ba (135)	Cd ⁺ , Sb ⁺ , Pb ⁺ , Al ⁺ , As ⁺ , Ni ⁺ e Ba ⁺	107
Água atmosférica e de lago	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas	Al (27), Cr (52), Zn (66), As (75), Cd (111), Sn (118), Hg (202) e Pb (208)	Al ⁺ , Cr ⁺ , Zn ⁺ , As ⁺ , Cd ⁺ , Sn ⁺ , Hg ⁺ e Pb ⁺	108
Plasma, urina e líquido peritoneal	Diluição em ácido nítrico	Pt (194 e 195)	Pt ⁺	109
Coração humano	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas	Co (59), Cr (52) e V (51)	Co ⁺ , Cr ⁺ e V ⁺	110

Tabela 3. Levantamento bibliográfico dos trabalhos que utilizam ICP-MS para determinação de elementos inorgânicos (continuação).

Amostra	Preparo de amostra	Analito e isótopo	Íon monitorado	Referência
Pimenta	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas	Al (27), V (51), Cr (53), Mn (55), Fe (57), Ni (60), Cu (63), Zn (66), As (75), Cd (111) e Pb (208)	Al ⁺ , V ⁺ , Cr ⁺ , Mn ⁺ , Fe ⁺ , Ni ⁺ , Cu ⁺ , Zn ⁺ , As ⁺ , Cd ⁺ e Pb ⁺	111
Células de levedura	Centrifugação + adição de HNO ₃ + aquecimento em banho maria	Mg (24), K (39), Mn (55), Cu (63), Zn (66) e Sc (45)	Mg ⁺ , K ⁺ , Mn ⁺ , Cu ⁺ , Zn ⁺ e Sc ⁺	112
Chá de fita	Aquecimento em chapa elétrica até a ebulição + filtração	Li (7), K (39), Mn (55), Fe (56), Co (59), Ni (60), Cu (63), Zn (64), Mo (98), Cd (114), Ba (137) e Pb (208)	Li ⁺ , K ⁺ , Mn ⁺ , Fe ⁺ , Co ⁺ , Ni ⁺ , Cu ⁺ , Zn ⁺ , Mo ⁺ , Cd ⁺ , Ba ⁺ e Pb ⁺	113
Gasolina	Extração induzida por quebra de microemulsão	Mn (55), Cd (111), Sb (121) e Pb (208)	Mn ⁺ , Cd ⁺ , Sb ⁺ e Pb ⁺	114
Grãos de cacau, cacau em pó e chocolate	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas	As (75), Cd (111), Sb (121) e Pb (208)	As ⁺ , Cd ⁺ , Sb ⁺ e Pb ⁺	115
Urina	Acidificação com HNO ₃	U (235 e 238)	U ⁺	116

2.6. Análises estatísticas

2.6.1. Análise discriminante linear

A análise discriminante linear (LDA) foi desenvolvida por Ronald A. Fisher, em 1936, com intuito de resolver problemas associados à área da botânica. Fisher buscou um critério que maximizasse a separação entre duas ou mais classes de amostras levando em consideração suas características peculiares.¹¹⁷

A LDA é uma técnica semelhante à análise de componentes principais (PCA), pois também é um procedimento estatístico multivariado que tem como objetivo reduzir a dimensionalidade dos dados. No entanto, a LDA é uma técnica de redução de dimensionalidade supervisionada, o que significa que a existência do grupo é conhecida. Com isso, essa técnica pode ser usada para classificar amostras em grupos identificáveis, utilizando uma combinação linear de variáveis, também conhecida como função discriminante, que maximizam a distância entre os grupos e minimizam a distância intra-grupo.^{118,119,120}

A LDA é aplicada quando a variável dependente é qualitativa (representando os diferentes grupos) e as variáveis independentes são quantitativas e/ou qualitativas.¹²¹ O objetivo é que através das variáveis independentes seja possível distinguir os grupos da variável dependente, ou seja, esta pretende descobrir as características (variáveis explicativas) que distinguem os membros de um grupo dos de outro, de forma que conhecidas as características de um novo caso, seja possível classificar a que grupo de variável dependente pertencerá. Essa classificação deve ser feita de maneira que a probabilidade de classificar erroneamente um indivíduo em uma população, quando ele na verdade pertence à população seja mínima.¹²²

Esse método é considerado como um método de classificação 'rígido', pois cada amostra é classificada como membro de apenas um grupo. Como desvantagem, a LDA só pode ser realizada se o número de variáveis for menor que o número total de amostras e, portanto, métodos de seleção de variáveis como PCA são frequentemente necessários antes da classificação.¹¹⁸

Na literatura são encontrados trabalhos de aplicação da LDA em diversas áreas. Na química, essa técnica já foi utilizada para a identificação e

diferenciação de isômeros posicionais usando espectros de massas,¹²³ para a caracterização de compostos de acordo com a classe estrutural baseada em características espectrais de massa,¹¹⁷ etc.

Ferreira et al.¹²² criaram um modelo utilizando LDA para a detecção antecipada de acidemia em fetos humanos. Hannon et al.¹²⁰ utilizaram LDA para classificação em grupos de bentonitas com base no estágio geológico, formação e leitões únicos, utilizando concentrações elementares chave e isótopos radiogênicos. Mills et al.¹²⁴ desenvolveram um método utilizando LDA que oferece o potencial de fornecer critérios objetivos para comparações microscópicas forenses de cabelos. Naseer et al.¹²⁵ investigaram o potencial das técnicas de Raman e PCA-DA para diferenciar tipos de condições patológicas causadas pela dengue e pela febre tifoide, visto que os sintomas das duas doenças são semelhantes. Os autores alcançaram resultados impressionantes na classificação dos dois tipos de doenças e concluíram que a fusão PCA e LDA melhora bastante o desempenho de discriminação.

2.6.2. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica multivariada de redução de dimensionalidade frequentemente usada em estudos quimiométricos. A PCA é uma maneira de identificar padrões nos dados e expressá-los de maneira a evidenciar suas semelhanças e diferenças, sendo também considerada como um método exploratório, pois auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados.¹²⁶

Essa técnica consiste em transformar um conjunto de variáveis originais, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original. Em uma PCA o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados pela construção de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis.^{127,128,129}

Cada PC é uma combinação linear de todas as variáveis originais. São independentes entre si e estimadas com o propósito de reter o máximo de

informação, em termos de variação total contida nos dados. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre as amostras e variáveis com os gráficos dos *scores* e dos *loadings*. Em um modelo de PCA espera-se reduzir a dimensão para 2 ou 3 componentes, os quais possuem a maior parte da informação contida no conjunto de dados.¹³⁰

Devido à capacidade de gerenciar e interpretar grandes conjuntos de dados, a PCA é frequentemente usada para processamento de dados em diferentes áreas da química.

A área forense, por exemplo, aplica a PCA na análise de tintas,¹³¹ na determinação da rota sintética de drogas,¹³² na diferenciação e identificação de medicamentos análogos,¹³³ etc. No ramo da química de alimentos, essa técnica é frequentemente utilizada na classificação e avaliação da autenticidade das amostras através de suas características químicas.^{134,135,136} Fraige e colaboradores¹³⁷ estudaram o perfil de antocianina de 11 variedades de uvas cultivadas no Brasil e utilizaram a PCA para avaliar diferenças entre as cultivares. Liu et al.¹³⁸ usaram a PCA na determinação de adulterantes do leite. Brito et al.¹³⁹ avaliaram 60 farinhas funcionais de 20 tipos diferentes usando técnicas espectroanalíticas para determinar macronutrientes, micronutrientes e elementos não essenciais, e aplicaram a PCA para explorar a influência das variáveis na formação de agrupamentos naturais.

A variabilidade de aplicações da PCA na solução de problemas envolvendo dados químicos a tornaram a técnica de classificação não supervisionada mais conhecida e consolidada na literatura.

2.6.3. Floresta Randômica

Floresta randômica (RF) se caracterizam por um algoritmo de aprendizagem de máquina supervisionado desenvolvido por Breiman (2001).¹⁴⁰ Este algoritmo é flexível, fácil de usar e na maioria das vezes produz excelentes resultados mesmo sem nenhuma preparação de dados ou ajuste de hiperparâmetros. Devido a sua simplicidade e o fato de poder ser utilizado para tarefas de classificação e de regressão, a RF se tornou um dos algoritmos de aprendizagem mais utilizados.^{141,142}

Como o próprio nome diz, esse algoritmo cria uma floresta de modo aleatório. A floresta que ele cria é uma combinação de árvores de decisão (também conhecidas como árvores de classificação e regressão - CART), na maioria dos casos treinados com o método de *bagging*. *Bagging* é uma palavra artificial formada a partir da combinação de palavras, também conhecida como *bootstrapping aggregation*. O uso do *bootstrapping aggregation* reduz o erro quadrático médio e diminui a variância do classificador treinado. Com isso, o erro não será muito diferente em diferentes amostras, como resultado, o modelo sofrerá menos sobreajustes.^{140,143,144}

Uma árvore de decisão é um modelo bastante simples que possui ramificações, nós e folhas. Os nós contêm os atributos dos quais a função objetivo é dependente. Então os valores da função objetivo vão para as folhas através dos ramos. No processo de classificação de um novo caso, é necessário descer a árvore através de seus ramos até uma folha, passando por todos os valores dos atributos. Dependendo dessas condições, a variável objetiva receberá um valor específico ou uma classe (a variável objetiva cairá em uma folha específica). Todo esse processo de construção de uma única árvore é repetido até que se conclua o número de árvores pre-definidas.^{142,145}

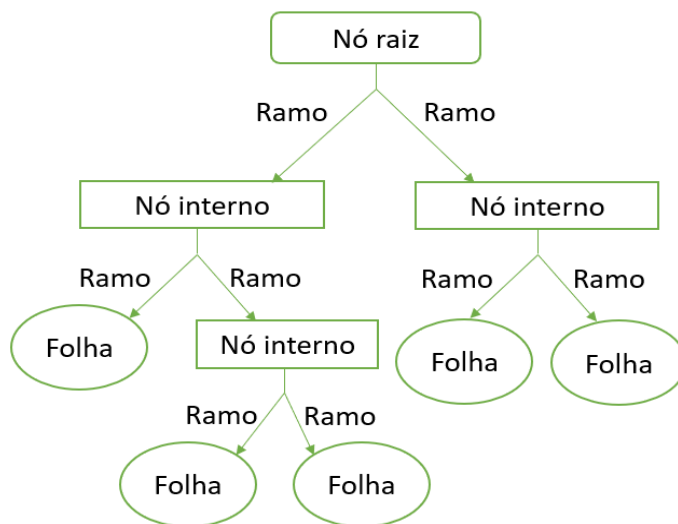


Figura 2. Esquema de uma árvore de decisão.¹⁴⁶

Para a decisão da variável preditora em cada nó são atribuídos critérios de partição binária, o mais conhecido é o índice de impureza de Gini. O índice de Gini mede o grau de heterogeneidade dos dados e pode ser definido pela Equação (1):

$$\text{Índice Gini} = 1 - \sum_{i=1}^c p_i^2 \quad (1)$$

onde p_i é a frequência relativa de cada classe em cada nó, e c é o número de classes.¹⁴⁶

A diferença do índice de Gini entre o nó ascendente e nó descendente fornece um valor de ganho de informação que resulta na escolha da variável preditora (aquela que apresentou maior ganho de informação). Esse processo de divisões é interrompido quando a contagem de amostras no espaço é menor que a limitação mínima da quantidade de folhas predefinida; quando todas as amostras no subespaço representam a mesma classe.¹⁴⁴

De forma resumida, a RF cria várias árvores de decisão e as combinam para obter uma predição com maior acurácia e maior estabilidade. Na literatura o número total de árvores de decisão é variável, podendo ir de 300 a 2000 árvores. O que determina essa quantidade é a complexidade de informação na matriz original de dados.^{141,141}

A RF vêm sendo utilizada em diferentes áreas, tais como: setor bancário, mercado financeiro, saúde, etc.^{147,148,149,150,151,152} Na química, a potencialidade da RF tem sido confirmada em problemas de classificação quando associada principalmente aos métodos analíticos que permitem aquisição de grande quantidade de dados como: espectroscopia de infravermelho, RMN de ¹C, RMN de ¹³C, espectrometria de massas e cromatografia.¹⁴⁴

Na Figura 3 é apresentada a evolução do número de publicações sobre o algoritmo RF nos últimos 10 anos na química.¹⁵³ O levantamento feito na *Web of Science* mostra que ao longo dos anos houve um crescimento significativo na aplicação dessa técnica no tratamento de dados químicos, totalizando 1250 publicações nos últimos 10 anos.¹⁵³ Acredita-se que esse aumento de trabalhos é

resultante da habilidade que a RF possui em solucionar problemas que envolvem múltiplas classes.¹⁴⁴

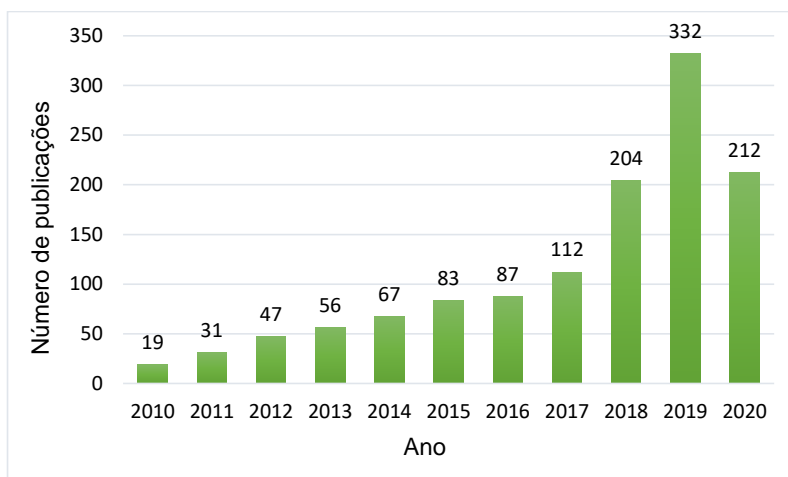


Figura 3. Número de publicações de RF em 10 anos nas áreas de química. Tópico (palavra-chave): *Random Forest and chemistry*.

Dentre as aplicações das RF na química, Maione et al.¹⁵⁴ utilizaram diferentes métodos dentre eles RF para discriminar dados de ICP-MS de amostras de arroz quanto à sua origem geográfica. Os resultados das RF para exatidão, sensibilidade e seletividade foram melhores em relação aos demais métodos estatísticos avaliados. Ai et al.¹⁵⁵ aplicaram as RF para selecionar óleos vegetais de qualidade *premium* através da sua composição de ácidos graxos. A análise de componentes principais (PCA) também foi aplicada para agrupar as amostras. As RF mostraram uma melhor capacidade de discriminação, além de revelarem a contribuição de cada variável para o modelo de agrupamento.

Canizo et al.¹⁵⁶ classificaram amostras de sementes de uvas de diferentes regiões de Mendoza (Argentina) com dados de metais obtidos por ICP-MS e diferentes técnicas quimiométricas com a finalidade de comparar seus desempenhos na discriminação dos grupos. Os autores concluíram que o método das RF mostrou um melhor desempenho comparado aos demais métodos, com valor de exatidão de 97%. Fathi et al.¹⁵⁷ utilizaram as RF para procurar biomarcadores metabólicos e sua correlação com o zinco em pacientes com doença de Crohn. O modelo de classificação para o conjunto de testes mostrou uma

classificação correta de 94% de indivíduos com doença de Crohn e indivíduos saudáveis. Ghaedi et al.¹⁵⁸ mostraram que as RF são uma ferramenta poderosa para prever a adsorção de azul de bromofenol por carvão ativado obtido da árvore *Astragalus bisulcatus*. O método forneceu uma boa previsão com valor do coeficiente de determinação (R^2) de 0,9895.

Materials e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras analisadas foram coletadas no período de 05/10/2016 à 17/10/2016 e fazem parte de um projeto de pesquisa da Embrapa Pecuária Sudeste voltado à determinação da pegada hídrica de bovinos de corte, sob a coordenação do pesquisador Dr. Julio Palhares e financiado pelo CNPq (“Pegada Hídrica dos Produtos Carne e Leite”).

Foram utilizados 52 animais machos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) não castrados nascidos no ano de 2014, que após alcançarem a idade de 15 meses foram divididos em dois grupos e submetidos a dois tipos de dietas: (1) uma dieta convencional, com alto teor de grãos (silagem de milho e farelo de soja), considerado grupo testemunha, e o outro, (2) uma dieta com substituição total do milho e do farelo de soja por subprodutos (polpa cítrica e farelo de amendoim). O experimento durou 105 dias, dos quais 15 dias foram necessários para a adaptação dos animais às instalações e às dietas.

Após o abate foram coletadas as amostras de músculo (*Longissimus dorsi*), localizado entre a 12ª e 13ª costela do animal. As amostras de fezes foram coletadas duas semanas antes do abate dos animais e para o rúmen, foi coletada uma fração sólida e líquida cerca de 15 minutos após o abate dos animais.

Materiais de referência certificados (CRMs) de fígado bovino (NIST 1577a) e músculo bovino (NIST 8414) foram utilizados para avaliar a exatidão do método de preparo empregado para as amostras de músculo. Como não existe material de referência certificado para amostras de fezes e líquido ruminal de bovinos, a exatidão do método foi avaliada através da análise de CRMs com características semelhantes as amostras. Foram utilizados os CRMs de folha de tomateiro (NIST 1573) e folha de macieira (NIST 1515).

3.2 Instrumentação

Todas as amostras de líquido ruminal, músculo e fezes foram liofilizadas (Modelo EC, MicroModulyo, New York, NY, USA) e moídas em um

moinho criogênico (MA775, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) empregando nitrogênio líquido.

Para o preparo das amostras foi utilizado um sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas (Multiwave Go Plus, Anton Paar, Graz, Áustria) contendo rotor de 12 fracos.

As determinações dos macro (Ca, Mg, P, K, S e Na) e micronutrientes (Fe, Mn e Zn) foram realizadas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado - ICP OES (Agilent Technologies, Modelo 5110, Synchronous Vertical Dual View, Mulgrave, Austrália) com visualização simultânea, equipado com um detector do tipo CCD e rede de difração do tipo Echelle, bomba peristáltica para propulsão dos fluidos, nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica e uma tocha de quartzo com tubo injetor central de 2.0 mm de diâmetro interno. O argônio líquido foi utilizado como gás de purga e plasma (99,999% de pureza, White Martins, Sertãozinho, SP, Brasil). As condições operacionais e os comprimentos de onda selecionados para determinação dos analitos por ICP OES nas amostras de fezes e líquido ruminal estão apresentados na Tabela 4. Na Tabela 5 são apresentados os comprimentos de onda selecionados para determinação dos analitos por ICP OES nas amostras de músculo. As demais condições operacionais são as mesmas descritas na Tabela 4.

As determinações de elementos traço Co, Cu, Cr, Mo, Se e V foram realizadas em um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado - ICP-MS (Modelo 7800, Agilent Technologies, Japão) equipado com cela de colisão e reação, câmara de nebulização Scott-duplo passo e tocha de quartzo. Na Tabela 6 estão apresentadas as condições operacionais e as razões massa/carga monitoradas para leitura das amostras de fezes, líquido ruminal e músculo no ICP-MS.

Tabela 4. Condições operacionais para a determinação de Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S, Zn e Mn por ICP OES.

Parâmetro Instrumental	Condição operacional
Potência aplicada ao plasma(kW)	1,2
Fluxo de gás no plasma (L min ⁻¹)	12,0
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7 (todos analitos)
Posição de visualização	Axial e radial
Tempo de estabilização (s)	15
Tempo de integração (s)	3
Nebulizador	Concêntrico
Número de replicatas	3
Analitos	Comprimentos de onda (nm)
Ca	393,366 (II)
Fe	238,204 (I)
K	769,897 (II)
Mg	280,270 (I)
Na	588,995 (I)
P	213,618 (I)
S	181,972 (I)
Zn	213,857 (I)
Mn	257,610 (II)

(I) axial, (II) radial

Tabela 5. Comprimentos de onda empregados para análise de Ca, Fe, K, Mg, S e Zn no músculo por ICP OES.

Analitos	Comprimentos de onda (nm)
Ca	393,366 (I)
Fe	238,204 (II)
K	766,491 (II)
Mg	279,553 (I)
S	181,972 (II)
Zn	213,857 (II)

(I) axial, (II) radial

Tabela 6. Condições operacionais para a determinação de Co, Cu, Cr, Mo, Se e V por ICP-MS.

Parâmetro Instrumental	Condição operacional
Potência aplicada ao plasma (kW)	1,55
Fluxo de gás no plasma (L min ⁻¹)	15,0
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,42 (todos analitos)
Tempo de estabilização (s)	20
Tempo de integração/massa (s)	0,3
Gás de diluição (L min ⁻¹)	0,6
Taxa de fluxo (mL min ⁻¹)	4,5
Nebulizador	Micro Mist
Número de replicatas	3
Analitos	Razões de massa/carga monitoradas
Cr	52 (He)
Mo	95 (He)
V	51 (He)
Co	59 (He)
Cu	63 (He)
Se	78 (He)

3.3 Reagentes e soluções padrão

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida a partir do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Todo material utilizado foi previamente lavado e desmineralizado em banho de ácido nítrico 10% (v v⁻¹) por 24 h, com posterior lavagem com água deionizada e desmineralizada e secagem em capela de fluxo laminar.

Para a digestão das amostras foi empregado HNO₃ (Synth, Diadema, SP, Brasil) previamente purificado em um sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição, modelo BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha) e H₂O₂ 30% (m m⁻¹) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha). As soluções utilizadas para a construção das curvas analíticas de calibração foram preparadas a partir da diluição de soluções

padrão comerciais de 1000 mg L⁻¹ de Ca, Mg, P, K, S, Na, Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Cr, Mo, Se e V (Fluka, Buchs, St. Gallen, Suíça).

3.4 Preparo de amostras

3.4.1 Liofilização e moagem

Todas as amostras de líquido ruminal (n=52), fezes (n=52) e músculo (n=52) foram liofilizadas individualmente (Modelo EC, MicroModulyo, New York, NY, USA) por 48 horas. Em seguida, cada amostra foi submetida a moagem criogênica (Modelo MA775, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), de acordo com o seguinte programa: 1 min de pré-congelamento e, 1 min de moagem, alternados com intervalos de 30 s de congelamento. Por fim, as amostras foram identificadas e armazenadas em frascos de polipropileno.

3.4.2 Procedimento de digestão assistida por radiação micro-ondas

As amostras de fezes, líquido ruminal e músculo, bem como os materiais de referência certificados foram digeridos em triplicata, em forno assistido por radiação micro-ondas com sistema fechado. Foram utilizados 0,1 g de amostra, 6,0 mL de HNO₃ 7,0 mol L⁻¹ e 2,0 mL de H₂O₂ 30% (m m⁻¹). O seguinte programa de aquecimento foi utilizado: rampa de 20 min a 190 °C, um patamar de 20 min a 190 °C e 10 min de resfriamento. Após o término das digestões, os digeridos foram transferidos para tubos de polipropileno e avolumados para 15 mL com água deionizada.

A fim de não ultrapassar a acidez e o teor de sólidos dissolvidos sugeridos pelo fabricante dos equipamentos, de 10% (v v⁻¹) e 3% (m v⁻¹), respectivamente, para o ICP OES, e 5% (v v⁻¹) e 0,1% (m v⁻¹) para o ICP-MS, todas as amostras foram diluídas duas e vinte vezes, respectivamente antes das análises por ICP OES e por ICP-MS.

3.5 Análise estatística

Devido ao grande volume de resultados gerados, testes estatísticos foram realizados para cada analito avaliado, a fim de verificar se havia diferença estatística entre as dietas. Primeiramente, foi avaliada se a distribuição dos dados

era normal. Neste caso o teste t de Student foi aplicado. No caso de distribuição não normal, o teste de Mann-Whitney foi realizado. Para ambos os testes se assumiu um intervalo de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ indica que a diferença entre as médias é estatisticamente significativa.

O software Python versão 3 com os pacotes *Scikit-Learn*, *Statsmodel*, *Scipy*, *Matplotlib* e *Seaborn* foi utilizado para a análise de componentes principais (PCA), análise discriminante linear (LDA) e para o algoritmo floresta randômica (RF). Para garantir que as influências relativas das diferentes variáveis no modelo fossem independentes das unidades utilizadas, os dados foram padronizados por escalonamento automático antes das análises.

Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação do método

4.1.1 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada, com determinada certeza estatística.¹⁵⁹

Os limites de detecção e quantificação foram calculados seguindo as recomendações da IUPAC.¹⁶⁰ O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão de 10 medidas consecutivas da solução do branco, dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração, ou seja, sensibilidade do método. O LOQ foi calculado usando 10 vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração.

Os valores de LOD e LOQ para o procedimento proposto estão apresentados na Tabela 7.

Os valores de LOQ aqui obtidos são comparáveis aos relatados na literatura usando técnicas espectroscópicas para determinação de macro e micronutrientes em amostras de carne. Higuera et al.⁸² determinaram Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, K, Na, P e S na carne de frango, bovino e ovino por ICP OES, e obtiveram LOQ de 19, 10, 1, 2, 58 mg kg⁻¹ para Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, respectivamente. Para K, Na, P e S, esses valores foram de 0,001, 0,002, 0,0003 e 0,002 g kg⁻¹. Vieira et al.¹⁶¹ determinaram Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S e Zn em amostras de carne pelo ICP OES, com LOQ de 2, 0,5, 1,5, 1,2, 0,4, 0,1, 5, 4, 4 e 1 mg kg⁻¹, respectivamente.

Tabela 7. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para as determinações por ICP OES e ICP-MS respectivamente.

Analito	Fração de massa (mg kg ⁻¹)	
	LOD	LOQ
Ca	0,4	1,3
Fe	0,5	1,7
S	15,7	52,3
Na	5,2	17,3
K	0,7	2,2
Mn	0,02	0,07
Mg	0,1	0,5
Zn	0,04	0,1
P	0,03	0,1

Analito	Fração de massa (µg kg ⁻¹)	
	LOD	LOQ
V	3,7	12,5
Cr	3,1	10,3
Co	0,08	0,3
Cu	0,9	2,9
Se	0,2	0,7
Mo	0,4	1,3

4.1.2 Linearidade e faixa dinâmica linear

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito na amostra, enquadrados em uma faixa analítica especificada. A avaliação da linearidade pode ser feita utilizando-se o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R²). Essa avaliação deve ser feita a partir da determinação de, no mínimo, 5 concentrações distintas e o critério mínimo aceitável é 0,99 para R e 0,98 para R².¹⁵⁹

A faixa dinâmica linear ou faixa de aplicação corresponde à faixa de concentração que pode ser determinada com uma curva de calibração linear.

Os resultados das curvas analíticas estão apresentados resumidamente na Tabela 8. Uma boa linearidade foi estabelecida, com coeficientes de determinação (R²) superiores a 0,999 para todos os analitos.

Tabela 8. Curvas analíticas dos analitos determinados por ICP OES e ICP-MS.

Analitos	Equação da reta	R²	Faixa dinâmica linear (mg L⁻¹)
Ca	$y = 130009x + 217540$	0,9993	0,01-10
Fe	$y = 25780x + 364,53$	0,9996	0,01-5
S	$y = 211,7x + 43,23$	0,9999	1-100
Na	$y = 668693x + 89006$	0,9995	0,1-20
K	$y = 1881,8x + 12985$	0,9996	0,01-100
Mn	$y = 77917x + 956,43$	0,9998	0,01-5
Mg	$y = 159038x + 10190$	0,9991	0,01-10
Zn	$y = 34902x - 1,74$	0,9997	0,01-10
P	$y = 1241,9x + 20,02$	0,9999	0,01-100
Analitos	Equação da reta	R²	Faixa dinâmica linear (µg L⁻¹)
V	$y = 33529x + 323,16$	0,9999	0,05-10
Cr	$y = 3090,9x - 114,57$	0,9999	0,1-50
Co	$y = 17804x + 155,37$	0,9998	0,05-5
Cu	$y = 15883x + 617,54$	0,9999	0,05-50
Se	$y = 4,3038x - 4,9211$	0,9991	0,2-10
Mo	$y = 8006x + 78,978$	0,9999	0,05-10

4.1.3 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que revela o grau de concordância entre o resultado experimental obtido e o valor aceito como referência da medida. Os quatro principais métodos recomendados para o estudo da exatidão são baseados no uso de material de referência certificado (CRM), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos.¹⁵⁹

Neste trabalho, a exatidão do método foi avaliada através da análise de materiais de referência certificado de músculo bovino (NIST 8414), fígado bovino (NIST 1577a), folha de tomateiro (NIST 1573) e folha de macieira (NIST 1515). Os CRMs NIST 1573 e NIST 1515 foram utilizados para avaliar a exatidão do método, pois não há material de referência certificado de fezes e líquido ruminal de bovinos. Foram escolhidos em função da presença de fibras e proteínas, similares às amostras.

Os valores certificados e determinados para todos os CRMs estão apresentados nas Tabelas 9, 10, 11 e 12. O teste t (Student) não pareado com nível de confiança de 95% mostrou que não houve diferença significativa entre os valores determinados e certificados para esses analitos. As recuperações foram satisfatórias para todos os CRMs avaliados, na faixa de 80 a 106%, podendo-se concluir que o método proposto com determinação dos elementos por ICP OES e ICP-MS apresenta boa exatidão. As exceções foram o Fe e o Zn no CRM de músculo bovino, com recuperação de 66 e 78% respectivamente, e o V no CRM de folha de macieira com recuperação de 76%.

Tabela 9. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de fígado bovino (NIST 1577c) determinados por ICP OES e ICP-MS.

Analito	Técnica	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
Ca	ICP OES	131 ± 10	132 ± 2	101
Fe	ICP OES	197,94 ± 0,64	188,47 ± 1,14	93
Mg	ICP OES	620 ± 40	687 ± 1	104
Mn	ICP OES	10,46 ± 0,47	8,46 ± 0,15	81
Zn	ICP OES	181,1 ± 1,0	163,3 ± 1,3	90
		% (g/100g)	% (g/100g)	
K	ICP OES	1,023 ± 0,064	1,082 ± 0,008	106
Na	ICP OES	0,203 ± 0,006	0,215 ± 0,005	106
S	ICP OES	0,749 ± 0,034	0,782 ± 0,009	104
P	ICP OES	1,17 ± 0,027	1,17 ± 0,006	100
Analito	Técnica	Valor certificado (ug kg⁻¹)	Valor obtido (ug kg⁻¹)	Recuperação (%)
V	ICP-MS	8,17 ± 0,66	< LOQ	-
Cr	ICP-MS	53 ± 14	49 ± 1	92
		(mg kg⁻¹)	(mg kg⁻¹)	
Co	ICP-MS	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,04	89
Cu	ICP-MS	275, 2 ± 4,6	269,8 ± 6,7	98
Se	ICP-MS	2,03 ± 0,04	1,84 ± 0,46	91
Mo	ICP-MS	3,30 ± 0,13	3,29 ± 0,18	100

Tabela 10. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de músculo bovino (NIST 8414) determinados por ICP OES e ICP-MS.

Analito	Técnica	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
Ca	ICP OES	145 ± 20	122 ± 20	84
Fe	ICP OES	71,2 ± 9,2	48,1 ± 1,0	66
Mg	ICP OES	960 ± 95	941 ± 4	92
Mn	ICP OES	0,37 ± 0,09	0,37 ± 0,02	100
Zn	ICP OES	142 ± 14	110 ± 0,3	78
		% (g/100g)	% (g/100g)	
K	ICP OES	1,517 ± 0,037	1,527 ± 0,004	100
Na	ICP OES	0,210 ± 0,008	0,189 ± 0,003	90
S	ICP OES	0,795 ± 0,041	0,815 ± 0,003	102
P	ICP OES	0,836 ± 0,045	0,814 ± 0,002	97
Analito	Técnica	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
V	ICP-MS	0,005	< LOQ	-
Cr	ICP-MS	0,071 ± 0,038	0,061 ± 0,025	86
Co	ICP-MS	0,007 ± 0,003	< LOQ	-
Cu	ICP-MS	2,84 ± 0,45	2,28 ± 0,29	80
Se	ICP-MS	0,076 ± 0,010	0,069 ± 0,031	91
Mo	ICP-MS	0,08 ± 0,06	0,07 ± 0,04	87

Tabela 11. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de tomateiro (NIST 1573) determinados por ICP OES e ICP-MS.

Analito	Técnica	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
Ca	ICP OES	50450 ± 550	47965 ± 112	95
Fe	ICP OES	367,5 ± 4,3	348,3 ± 2,2	95
Mg	ICP OES	12000*	9543 ± 187	80
Mn	ICP OES	246,3 ± 7,1	241,9 ± 2,3	98
Zn	ICP OES	30,94 ± 0,55	27,15 ± 0,19	88
K	ICP OES	26760 ± 480	25966 ± 274	97
Na	ICP OES	136,1 ± 3,7	130,6 ± 2,5	96
S	ICP OES	9600*	9199 ± 131	96
P	ICP OES	2161 ± 28	2102 ± 39	97
Analito	Técnica	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
V	ICP-MS	0,835 ± 0,034	0,824 ± 0,010	99
Cr	ICP-MS	1,988 ± 0,034	1,773 ± 0,018	89
Co	ICP-MS	0,577 ± 0,007	0,564 ± 0,005	99
Cu	ICP-MS	4,70 ± 0,14	4,35 ± 0,33	93
Se	ICP-MS	0,054 ± 0,002	0,052 ± 0,007	96
Mo	ICP-MS	0,46*	0,45 ± 0,05	98

*valor fornecido como informação adicional, não contém o valor da incerteza.

Tabela 12. Comparação dos valores certificados e obtidos para CRM de folha de macieira (NIST 1515) determinados por ICP OES e ICP-MS.

Analito	Técnica	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
Ca	ICP OES	15250 ± 100	15203 ± 397	100
Fe	ICP OES	82,7 ± 2,6	71,0 ± 3,1	86
Mg	ICP OES	2710 ± 120	2580 ± 34	95
Mn	ICP OES	54,1 ± 1,1	46,3 ± 1,3	86
Zn	ICP OES	12,45 ± 0,43	10,77 ± 0,16	86
K	ICP OES	16080 ± 210	16410 ± 391	102
Na	ICP OES	24,4 ± 2,1	25,0 ± 1,2	103
S	ICP OES	1800*	1782 ± 24,9	99
P	ICP OES	1593 ± 68	1608 ± 157	101
Analito	Técnica	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor obtido (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)
V	ICP-MS	0,254 ± 0,027	0,193 ± 0,019	76
Cr	ICP-MS	0,3*	0,4 ± 0,07	110
Co	ICP-MS	0,09*	0,09 ± 0,01	97
Cu	ICP-MS	5,69 ± 0,13	4,65 ± 0,54	82
Se	ICP-MS	NC**	-	-
Mo	ICP-MS	0,095 ± 0,011	0,092 ± 0,094	97

*valor fornecido como informação adicional, não contém o valor da incerteza **NC=não contém

4.2 Aplicação analítica

O método proposto para digestão assistida por radiação micro-ondas das amostras de líquido ruminal, músculo e fezes de bovino otimizado foi aplicado em 52 amostras de bovinos da raça Nelore.

[R1] Comentário: Incluir uma referência

Cabe ressaltar que a dieta dos animais é baseada em vegetais que contêm altos teores de sílica. Sabe-se que o ácido nítrico não tem poder oxidante para decompor os óxidos de silício, portanto seria necessário o uso de ácido fluorídrico para obter a decomposição completa. No entanto, a decomposição completa não é necessária, sendo a digestão assistida por radiação micro-ondas com o emprego de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio eficiente para a determinação dos analitos avaliados, conforme foi comprovado pelas recuperações dos materiais de referência certificados e por estudos já documentados na literatura.⁵³

As amostras foram digeridas em triplicata, conforme procedimento descrito no item 3.4.2. Os teores de Ca, Mg, P, K, S, Na, Fe, Mn e Zn foram determinados por ICP OES e os teores de Co, Cu, Cr, Mo, Se e V por ICP-MS.

4.2.1 Resultados para líquido ruminal

As frações de massa dos macro e micronutrientes (média \pm desvio padrão, $n = 3$) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de líquido ruminal determinadas por ICP OES estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de líquido ruminal determinadas por ICP OES.

Animal Embrapa	Ca (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	S (mg kg ⁻¹)	Na (g 100g ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)
238	2280,4 ± 17,4 (0,8)	526,9 ± 6,9 (1,3)	1875,6 ± 130,8 (7,0)	16,7 ± 0,03 (0,2)	40,1 ± 0,4 (1,0)
242	4091,4 ± 232,8 (5,7)	755,5 ± 48,4 (6,4)	1422,3 ± 74,5 (5,2)	19,2 ± 0,4 (2,2)	31,4 ± 2,3 (7,3)
244	4779,3 ± 254,8 (5,3)	2374,2 ± 92,7 (3,9)	2018,8 ± 10,6 (0,5)	23,0 ± 0,8 (3,6)	48,9 ± 1,8 (3,6)
466	8723,5 ± 316,9 (3,6)	1702,4 ± 98,5 (5,8)	2257,4 ± 137,1 (6,1)	22,9 ± 0,1 (0,6)	52,1 ± 0,3 (0,5)
474	5957,2 ± 439,8 (7,4)	754,6 ± 68,4 (9,1)	2027,7 ± 33,4 (1,6)	22,2 ± 0,6 (2,6)	45,6 ± 2,1 (4,7)
483	4351,8 ± 461,9 (11)	668,8 ± 77,1 (12)	1817,2 ± 115,9 (6,4)	21,2 ± 1,2 (5,5)	31,8 ± 4,2 (13)
492	7995,0 ± 580,8 (7,3)	653,3 ± 5,4 (0,8)	2220,4 ± 112,0 (5,0)	19,2 ± 0,1 (0,4)	36,1 ± 0,1 (0,4)
500	2693,1 ± 2,2 (0,1)	4700,2 ± 113,9 (2,4)	1611,5 ± 78,9 (4,9)	18,0 ± 0,3 (1,5)	37,3 ± 0,1 (0,1)
502	7758,8 ± 474,6 (6,1)	3931,1 ± 255,2 (6,5)	2108,7 ± 32,9 (1,6)	26,1 ± 2,0 (7,5)	74,5 ± 5,0 (6,7)
505	2811,8 ± 70,3 (2,5)	1194,3 ± 3,9 (0,3)	2108,6 ± 22,9 (1,1)	18,9 ± 0,4 (2,1)	43,4 ± 3,2 (7,4)
506	5376,9 ± 54,6 (1,0)	9117,2 ± 135,7 (1,5)	1812,0 ± 41,0 (2,3)	22,8 ± 0,1 (0,5)	59,9 ± 1,7 (2,9)
510	4746,8 ± 255,6 (5,4)	632,9 ± 20,1 (5,0)	2453,0 ± 16,8 (0,7)	29,9 ± 1,5 (5,0)	54,9 ± 4,6 (8,4)
511	5247,2 ± 266,5 (5,1)	669,6 ± 8,6 (1,3)	1833,0 ± 129,8 (7,1)	23,7 ± 0,5 (2,3)	45,5 ± 2,2 (4,7)
514	5099,9 ± 280,6 (5,5)	895,8 ± 91,3 (10)	1911,0 ± 363,3 (19)	19,9 ± 2,0 (9,9)	67,0 ± 4,9 (7,3)
515	3655,8 ± 120,8 (3,3)	757,9 ± 21,4 (2,8)	1918,8 ± 4,3 (0,2)	18,3 ± 0,4 (2,0)	56,5 ± 2,5 (4,5)
517	8044,0 ± 208,0 (2,6)	739,0 ± 25,1 (3,4)	1968,1 ± 54,9 (2,8)	22,9 ± 0,3 (1,3)	51,4 ± 1,4 (2,8)
523	7474,0 ± 483,1 (6,5)	12756,9 ± 151,1 (1,2)	1731,6 ± 9,1 (0,5)	20,3 ± 0,1 (0,3)	139,9 ± 0,4 (0,3)
1460	2784,6 ± 14,8 (0,5)	1417,2 ± 36,9 (2,6)	1788,3 ± 196,0 (11)	20,5 ± 0,01 (0,1)	41,7 ± 0,8 (2,0)
1468	4716,5 ± 45,8 (1,0)	1453,0 ± 9,0 (0,6)	2055,9 ± 7,4 (0,4)	27,0 ± 0,2 (0,6)	37,9 ± 0,5 (1,2)
1476	4303,0 ± 79,8 (1,9)	1258,5 ± 45,8 (3,6)	2205,9 ± 42,7 (1,9)	21,6 ± 0,8 (3,6)	35,0 ± 0,6 (1,6)
1480	4914,7 ± 42,3 (0,9)	1028,8 ± 12,0 (1,2)	2385,8 ± 15,8 (0,7)	17,8 ± 0,1 (0,6)	38,4 ± 0,9 (2,4)
1481	4755,9 ± 5,4 (0,1)	438,2 ± 29,5 (6,7)	2063,0 ± 23,7 (1,1)	22,8 ± 0,8 (3,3)	39,0 ± 3,5 (8,9)
1493	5112,2 ± 65,1 (1,3)	9165,8 ± 249,5 (2,7)	1683,1 ± 23,7 (1,4)	19,4 ± 0,2 (1,2)	41,6 ± 0,9 (2,1)
1500	11759,9 ± 568,9 (4,8)	2985,6 ± 65,5 (2,2)	2013,6 ± 56,6 (2,8)	26,2 ± 1,0 (3,7)	54,5 ± 6,0 (11)
1502	3777,4 ± 63,4 (1,7)	920,4 ± 19,1 (2,1)	2269,9 ± 29,4 (1,3)	14,2 ± 0,01 (0,1)	53,5 ± 0,4 (0,7)
239	6719,6 ± 25,1 (0,4)	17799,1 ± 119,7 (0,7)	1488,1 ± 89,5 (6,0)	17,1 ± 0,2 (1,0)	63,9 ± 0,2 (0,3)
240	8235,5 ± 216,2 (2,6)	9591,2 ± 533,0 (5,6)	1357,4 ± 47,2 (3,5)	20,9 ± 0,3 (1,6)	61,4 ± 5,9 (9,6)
246	6061,0 ± 340,2 (5,6)	755,3 ± 60,0 (7,9)	1729,7 ± 117,6 (6,8)	18,4 ± 1,1 (6,2)	57,8 ± 3,5 (6,1)
464	10424,9 ± 243,4 (2,3)	720,1 ± 29,3 (4,1)	2403,6 ± 1,8 (0,1)	23,9 ± 0,2 (0,9)	59,9 ± 3,7 (6,2)
468	3555,0 ± 554,6 (1,6)	39622,6 ± 165,5 (0,4)	1672,5 ± 39,9 (2,4)	13,4 ± 0,1 (0,9)	106,8 ± 6,4 (6,0)
470	5545,7 ± 52,8 (1,0)	15009,7 ± 751,3 (5,0)	1529,3 ± 54,6 (3,6)	20,9 ± 0,1 (0,5)	53,3 ± 0,5 (1,0)
479	12816,0 ± 714,3 (5,6)	3759,5 ± 138,5 (3,7)	2215,9 ± 158,9 (7,2)	17,8 ± 0,7 (4,1)	71,5 ± 11,8 (16)
490	19080,3 ± 576,2 (3,0)	9265,0 ± 368,5 (4,0)	1778,0 ± 38,1 (2,1)	23,8 ± 1,1 (4,5)	89,0 ± 7,9 (8,9)
491	8288,7 ± 464,2 (5,6)	7953,3 ± 42,2 (0,5)	1624,7 ± 23,5 (1,4)	21,8 ± 0,1 (0,2)	62,5 ± 1,5 (2,5)
494	11292,6 ± 24,4 (0,2)	17131,2 ± 68,4 (0,4)	1553,7 ± 43,7 (2,8)	23,2 ± 0,1 (0,2)	59,0 ± 0,3 (0,5)
499	15522,0 ± 611,5 (3,9)	2494,1 ± 265,3 (11)	2162,7 ± 201,3 (9,3)	21,5 ± 2,1 (9,8)	87,3 ± 17,1 (20)
516	13070,7 ± 147,7 (1,1)	3531,7 ± 38,2 (1,1)	3041,1 ± 98,9 (3,3)	20,5 ± 0,001 (0,01)	65,8 ± 2,0 (3,1)
520	3052,5 ± 24,6 (0,8)	712,6 ± 8,8 (1,2)	1878,1 ± 2,2 (0,1)	25,1 ± 0,2 (0,9)	40,5 ± 0,8 (2,1)
521	5296,7 ± 81,2 (1,5)	629,9 ± 17,0 (2,7)	2028,0 ± 337,8 (16,7)	20,6 ± 0,7 (3,3)	45,5 ± 1,3 (2,9)
1462	11357,5 ± 963,5 (8,5)	3642,6 ± 40,6 (1,1)	2057,4 ± 64,4 (3,1)	21,9 ± 0,1 (0,4)	63,4 ± 1,1 (1,7)
1464	5222,5 ± 74,1 (1,4)	1621,6 ± 112,4 (6,9)	1825,8 ± 30,7 (1,7)	18,8 ± 0,02 (0,1)	45,4 ± 0,1 (0,3)
1479	6514,4 ± 48,8 (0,7)	2931,6 ± 77,7 (2,7)	1764,1 ± 69,0 (3,9)	18,9 ± 0,3 (1,5)	61,6 ± 0,02 (0,03)
1485	7845,1 ± 307,9 (3,9)	1188,9 ± 67,8 (5,7)	2194,3 ± 2,1 (0,1)	22,8 ± 1,0 (4,6)	45,6 ± 2,1 (4,7)
1494	11236,9 ± 766,7 (6,8)	9286,7 ± 551,9 (5,9)	1480,3 ± 212,3 (14,3)	20,2 ± 19,1 (0,8)	44,5 ± 3,6 (8,1)
1495	5651,0 ± 274,8 (4,9)	731,0 ± 13,9 (1,9)	2173,6 ± 27,1 (1,2)	19,1 ± 0,1 (0,8)	49,0 ± 0,5 (1,0)
1496	6726,3 ± 863,8 (13)	1176,3 ± 200,9 (17)	2062,1 ± 151,9 (7,4)	19,6 ± 1,9 (10)	54,9 ± 7,1 (13)
1498	6757,1 ± 46,6 (0,7)	642,4 ± 26,4 (4,1)	2035,4 ± 48,4 (2,4)	23,3 ± 0,8 (3,6)	56,7 ± 1,5 (2,6)
1501	5054,5 ± 230,1 (4,6)	974,6 ± 40,8 (4,2)	2228,9 ± 255,3 (11,5)	16,0 ± 0,8 (4,9)	53,8 ± 2,3 (4,3)
1503	8544,5 ± 343,8 (4,0)	1970,6 ± 120,1 (6,1)	2049,3 ± 76,3 (3,7)	22,7 ± 0,9 (4,1)	83,8 ± 3,6 (4,3)
1504	6659,0 ± 194,8 (2,9)	1015,3 ± 5,1 (0,5)	2244,7 ± 148,8 (6,6)	15,7 ± 0,2 (1,0)	47,0 ± 0,6 (1,2)

Animais submetidos a dieta convencional

Animais submetidos a dieta com subprodutos

Tabela 13. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de líquido ruminal determinadas por ICP OES (continuação).

	Animal Embrapa	K (g 100g ⁻¹)	Mg (g 100g ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	P (g 100g ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	8,6 ± 0,02(0,2)	0,5 ± 0,004 (0,7)	67,9 ± 0,1 (0,2)	6,2 ± 0,01 (0,2)
	242	5,5 ± 0,3 (4,8)	0,2 ± 0,005 (2,9)	59,3 ± 1,4 (2,3)	7,2 ± 0,2 (3,1)
	244	7,7 ± 0,3 (4,1)	0,4 ± 0,01 (3,3)	62,5 ± 2,0 (3,2)	8,7 ± 0,3 (3,4)
	466	6,4 ± 0,05 (0,7)	0,4 ± 0,03 (6,5)	78,0 ± 0,8 (1,0)	9,5 ± 0,02 (0,3)
	474	6,3 ± 0,2 (3,3)	0,3 ± 0,02 (5,8)	75,7 ± 3,8 (5,0)	8,7 ± 0,5 (6,2)
	483	5,7 ± 0,1 (2,3)	0,2 ± 0,02 (7,8)	50,8 ± 4,8 (9,4)	6,8 ± 0,6 (8,5)
	492	5,1 ± 0,07 (1,4)	0,3 ± 0,001 (0,3)	46,4 ± 0,7 (1,6)	7,5 ± 0,1 (1,0)
	500	7,4 ± 0,1 (1,8)	0,4 ± 0,005 (1,3)	63,0 ± 0,8 (1,3)	6,7 ± 0,05 (0,7)
	502	9,6 ± 0,6 (6,2)	0,5 ± 0,04 (7,1)	90,9 ± 6,2 (6,9)	13,8 ± 0,9 (6,8)
	505	7,5 ± 0,1 (1,5)	0,5 ± 0,02 (3,3)	59,9 ± 1,0 (1,6)	6,5 ± 0,1 (1,4)
	506	9,0 ± 0,09 (1,0)	0,6 ± 0,002 (0,4)	86,5 ± 0,5 (0,6)	7,9 ± 0,04 (0,5)
	510	12,3 ± 0,08 (0,6)	0,7 ± 0,04 (5,2)	59,5 ± 3,3 (5,5)	9,9 ± 0,5 (5,4)
	511	8,5 ± 0,2 (1,9)	0,5 ± 0,01 (2,2)	73,5 ± 0,6 (0,8)	9,0 ± 0,1 (1,6)
	514	10,8 ± 0,7 (7,0)	0,5 ± 0,04 (8,6)	79,8 ± 5,2 (6,5)	9,2 ± 1,0 (10)
	515	7,7 ± 0,2 (2,9)	0,6 ± 0,02 (2,5)	80,1 ± 1,9 (2,4)	8,0 ± 0,1 (1,1)
	517	6,8 ± 0,1 (1,7)	0,3 ± 0,008 (2,6)	72,9 ± 2,2 (3,0)	8,1 ± 0,2 (2,3)
	523	8,7 ± 0,01 (0,1)	0,5 ± 0,001 (0,1)	85,9 ± 6,3 (7,3)	8,3 ± 0,01 (0,1)
	1460	6,6 ± 0,02 (0,3)	0,4 ± 0,0003 (0,1)	72,6 ± 1,5 (2,0)	7,7 ± 0,1 (1,3)
	1468	6,7 ± 0,09 (1,3)	0,3 ± 0,002 (0,8)	54,0 ± 0,4 (0,7)	7,9 ± 0,1 (0,7)
	1476	7,1 ± 0,2 (3,4)	0,3 ± 0,01 (3,6)	64,8 ± 2,2 (3,4)	7,3 ± 0,2 (2,1)
1480	4,9 ± 0,04 (0,8)	0,3 ± 0,004 (1,3)	67,0 ± 0,004 (0,01)	6,7 ± 0,1 (1,3)	
1481	6,9 ± 0,2 (3,4)	0,2 ± 0,01 (5,4)	53,8 ± 2,0 (3,8)	7,9 ± 0,3 (3,2)	
1493	6,6 ± 0,09 (1,4)	0,3 ± 0,004 (1,4)	73,0 ± 1,0 (1,4)	7,3 ± 0,1 (1,4)	
1500	7,8 ± 0,2 (2,9)	0,4 ± 0,004 (1,0)	61,0 ± 3,3 (5,4)	9,8 ± 0,3 (3,3)	
1502	7,6 ± 0,03 (0,3)	0,8 ± 0,002 (0,2)	95,4 ± 0,1 (0,1)	7,0 ± 0,01 (0,1)	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	6,9 ± 0,01 (0,1)	0,9 ± 0,01 (1,1)	92,4 ± 1,4 (1,6)	8,9 ± 0,1 (1,0)
	240	6,7 ± 0,09 (1,4)	0,4 ± 0,002 (0,5)	72,3 ± 1,1 (1,6)	7,5 ± 0,1 (1,2)
	246	7,9 ± 0,4 (5,6)	0,8 ± 0,04 (5,7)	91,9 ± 5,0 (5,4)	8,1 ± 0,5 (5,7)
	464	9,8 ± 0,1 (1,1)	0,5 ± 0,005 (1,0)	87,9 ± 1,1 (1,3)	10,2 ± 0,1 (1,0)
	468	7,6 ± 0,04 (0,6)	0,9 ± 0,004 (0,4)	99,8 ± 2,1 (2,1)	11,1 ± 0,1 (0,6)
	470	6,2 ± 0,03 (0,6)	0,3 ± 0,001 (0,3)	54,4 ± 0,4 (0,7)	7,2 ± 0,01 (0,1)
	479	6,5 ± 0,2 (3,4)	0,4 ± 0,01 (3,4)	63,4 ± 1,0 (1,5)	7,5 ± 0,3 (4,3)
	490	7,8 ± 0,2 (2,9)	0,5 ± 0,02 (4,0)	67,0 ± 2,0 (3,0)	9,4 ± 0,4 (4,2)
	491	7,7 ± 0,02 (0,2)	0,5 ± 0,003 (0,5)	83,8 ± 0,7 (0,9)	9,2 ± 0,04 (0,4)
	494	6,3 ± 0,04 (0,6)	0,4 ± 0,004 (1,0)	76,4 ± 0,2 (0,2)	10,7 ± 0,1 (0,5)
	499	8,7 ± 0,7 (7,9)	0,6 ± 0,05 (9,4)	105,7 ± 7,6 (7,2)	12,5 ± 1,4 (11)
	516	8,2 ± 0,03 (0,3)	0,7 ± 0,004 (0,5)	80,2 ± 0,7 (0,8)	9,8 ± 0,03 (0,3)
	520	9,1 ± 0,01 (0,1)	0,3 ± 0,003 (0,7)	70,2 ± 0,3 (0,5)	9,1 ± 0,01 (0,1)
	521	7,3 ± 0,2 (2,1)	0,5 ± 0,01 (3,0)	81,7 ± 2,2 (2,7)	7,3 ± 0,2 (3,2)
	1462	9,6 ± 0,1 (1,6)	0,5 ± 0,007 (1,3)	74,7 ± 0,8 (1,0)	13,0 ± 0,1 (0,7)
	1464	7,6 ± 0,05 (0,6)	0,4 ± 0,0004 (0,1)	56,5 ± 0,3 (0,6)	7,6 ± 0,0005 (0,01)
	1479	6,9 ± 0,06 (0,9)	0,5 ± 0,006 (1,3)	63,7 ± 0,7 (1,0)	8,1 ± 0,1 (1,2)
	1485	9,2 ± 0,5 (5,2)	0,4 ± 0,02 (5,8)	71,9 ± 3,1 (4,3)	9,3 ± 0,5 (5,0)
	1494	6,8 ± 0,5 (6,9)	0,4 ± 0,03 (7,7)	56,5 ± 3,7 (6,6)	10,5 ± 0,7 (6,3)
	1495	7,2 ± 0,05 (0,7)	0,6 ± 0,04 (7,3)	83,1 ± 4,4 (5,3)	9,1 ± 0,1 (0,9)
1496	5,8 ± 0,8 (14)	0,4 ± 0,05 (12)	61,7 ± 6,5 (11)	8,1 ± 0,9 (11)	
1498	8,8 ± 0,1 (1,7)	0,8 ± 0,02 (3,1)	92,5 ± 2,4 (2,5)	10,4 ± 0,3 (2,6)	
1501	6,9 ± 0,8 (12)	0,6 ± 0,03 (4,4)	79,1 ± 2,9 (3,7)	8,0 ± 0,4 (4,9)	
1503	7,5 ± 0,3 (3,6)	0,6 ± 0,02 (4,0)	70,9 ± 2,8 (3,9)	10,6 ± 0,4 (3,7)	
1504	5,9 ± 0,06 (1,0)	0,4 ± 0,002 (0,6)	75,7 ± 1,7 (2,2)	7,8 ± 0,1 (1,3)	

Para o Ca foram observadas frações de massa média de 5328 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta convencional e 9701 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta com subprodutos. Como as amostras apresentaram distribuição não normal, o teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 100$, $p\text{-valor} = 5,68 \cdot 10^{-5}$), indicando que a fração de massa de Ca é significativamente diferente entre os grupos.

Para o P, as médias foram de 8144 mg kg⁻¹ e 9236 mg kg⁻¹, respectivamente. De acordo com teste de Mann-Whitney ($W = 162$, $p\text{-valor} = 0,005$), os dois grupos eram significativamente diferentes.

Para o Fe foram obtidas média de 2459 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e média de 6166 mg kg⁻¹ para amostras de animais submetidos à dieta com subprodutos. O teste de Mann-Whitney revelou que os grupos eram significativamente diferentes ($W = 197$, $p\text{-valor} = 0,03$).

O Mn apresentou fração de massa média de 50 mg kg⁻¹ e 61 mg kg⁻¹ em amostras de líquido ruminal de animais submetidos à dieta convencional e por subprodutos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 139$, $p\text{-valor} = 0,001$) e indicou que os grupos são significativamente diferentes.

Para o K foram obtidas médias de 7535 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e média de 7490 mg kg⁻¹ para amostras de animais submetidos à dieta com subprodutos. O teste de Mann-Whitney revelou que os grupos eram significativamente diferentes ($W = 127$, $p\text{-valor} = 5,85 \cdot 10^{-5}$).

Para Na foram obtidas frações de massa média de 210000 mg kg⁻¹ e 200000 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e de subprodutos, respectivamente. O teste t (teste $t = 1,07$, $p\text{-valor} = 0,28$) confirmou que não há diferença significativa entre os resultados dos dois grupos. O mesmo comportamento estatístico foi observado para Zn e S. O Zn apresentou fração de massa média de 69 e 76 mg kg⁻¹ e para o S as médias foram de 1982 e 1943 mg kg⁻¹, respectivamente para os grupos submetidos à dieta convencional e com subprodutos, os valores do $p\text{-valor}$ foram 0,07 e 0,19.

Os resultados para Mg nas amostras de líquido ruminal apresentaram frações de massa médias de 4200 e 5400 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e com subprodutos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney revelou que os grupos eram significativamente diferentes ($W = 170$, $p\text{-valor} = 0,008$).

As frações de massa dos micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de líquido ruminal determinados por ICP-MS estão apresentados na Tabela 14.

Para o V foram observadas frações de massa média de 3,46 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta convencional e 5,99 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta com subprodutos. Como as amostras apresentaram distribuição não normal, o teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 204$, $p\text{-valor} = 0,04$), indicando que a fração de massa de V é significativamente diferente entre os grupos.

O Cr apresentou fração de massa média de 13,27 mg kg⁻¹ e 19,66 mg kg⁻¹ em amostras de líquido ruminal de animais submetidos à dieta convencional e por subprodutos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 179$, $p\text{-valor} = 0,01$) e indicou que os grupos são significativamente diferentes.

Para o Co, as médias foram de 0,50 mg kg⁻¹ e 0,59 mg kg⁻¹, respectivamente. De acordo com teste de Mann-Whitney ($W = 237$, $p\text{-valor} = 0,15$), os dois grupos não são significativamente diferentes. O mesmo foi observado para Cu e Mo. O Cu apresentou fração de massa média de 22,77 e 24,35 mg kg⁻¹ e o Mo de 2,0 e 1,9 mg kg⁻¹, respectivamente para os grupos submetidos à dieta convencional e com subprodutos, os valores do $p\text{-valor}$ foram 0,26 e 0,79. O Se apresentou frações de massa abaixo do limite de quantificação calculado.

Tabela 14. Frações de massa dos micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de líquido ruminal determinadas por ICP-MS.

	Animal Embrapa	V (mg kg ⁻¹)	Cr (mg kg ⁻¹)	Co (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Se (µg kg ⁻¹)	Mo (mg kg ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	1,4 ± 0,08 (5,3)	3,2 ± 0,03 (1,0)	0,2 ± 0,001 (0,5)	22,7 ± 0,1 (0,3)	< LOQ	1,7 ± 0,03 (2,0)
	242	2,2 ± 0,2 (7,3)	2,4 ± 0,09 (3,8)	0,4 ± 0,05 (10,0)	16,5 ± 0,7 (4,0)	< LOQ	1,5 ± 0,04 (2,8)
	244	6,5 ± 0,3 (4,4)	8,2 ± 0,3 (3,8)	0,8 ± 0,04 (5,2)	18,9 ± 0,9 (4,9)	< LOQ	1,3 ± 0,1 (10,0)
	466	3,4 ± 0,05 (1,6)	75,9 ± 10,7 (14,0)	0,9 ± 0,04 (4,8)	23,1 ± 0,4 (1,6)	< LOQ	3,3 ± 0,1 (4,4)
	474	3,3 ± 0,3 (8,4)	6,4 ± 0,3 (5,1)	0,7 ± 0,02 (2,9)	19,4 ± 0,4 (1,9)	< LOQ	1,7 ± 0,04 (2,7)
	483	2,1 ± 0,2 (9,8)	6,0 ± 0,7 (11,0)	0,5 ± 0,08 (14,0)	15,1 ± 0,9 (5,8)	< LOQ	1,1 ± 0,07 (6,8)
	492	2,6 ± 0,02 (0,8)	4,7 ± 0,1 (2,1)	0,4 ± 0,02 (6,0)	14,5 ± 0,3 (1,9)	< LOQ	2,3 ± 0,1 (5,9)
	500	1,4 ± 0,06 (4,5)	3,9 ± 0,3 (8,0)	0,2 ± 0,004 (2,1)	23,1 ± 1,3 (5,6)	< LOQ	1,8 ± 0,2 (8,7)
	502	11,2 ± 0,04 (0,4)	14,8 ± 0,5 (3,7)	0,8 ± 0,04 (5,1)	27,7 ± 0,6 (2,3)	< LOQ	2,4 ± 0,03 (1,1)
	505	3,8 ± 0,004 (0,1)	64,5 ± 15,4 (24)	0,6 ± 0,01 (1,3)	23,8 ± 0,2 (1,0)	< LOQ	1,6 ± 0,07 (4,3)
	506	2,7 ± 0,02 (0,7)	19,1 ± 0,2 (1,2)	0,3 ± 0,01 (3,6)	30,0 ± 0,7 (2,2)	< LOQ	3,0 ± 0,1 (3,3)
	510	0,3 ± 0,02 (6,1)	0,4 ± 0,07 (17,0)	0,6 ± 0,004 (0,7)	31,5 ± 0,2 (0,5)	< LOQ	2,6 ± 0,02 (0,7)
	511	2,1 ± 0,01 (0,3)	7,9 ± 0,2 (2,2)	0,2 ± 0,02 (9,2)	27,1 ± 0,7 (2,7)	< LOQ	2,6 ± 0,02 (0,7)
	514	2,9 ± 0,3 (12,2)	6,4 ± 1,0 (16,0)	0,3 ± 0,02 (8,3)	24,3 ± 2,7 (11)	< LOQ	1,9 ± 0,2 (8,9)
	515	2,8 ± 0,01 (0,3)	20,3 ± 0,5 (2,7)	0,8 ± 0,005 (0,6)	18,9 ± 0,2 (1,1)	< LOQ	1,3 ± 0,1 (7,7)
	517	1,9 ± 0,04 (2,3)	4,7 ± 0,3 (7,0)	0,6 ± 0,02 (3,6)	23,2 ± 0,7 (2,9)	< LOQ	1,5 ± 0,05 (3,2)
	523	3,2 ± 0,03 (0,9)	9,5 ± 0,9 (10,0)	0,3 ± 0,01 (3,2)	29,6 ± 0,2 (0,7)	< LOQ	2,4 ± 0,06 (2,5)
	1460	3,8 ± 0,2 (6,3)	16,4 ± 1,3 (8,0)	0,3 ± 0,02 (8,0)	24,1 ± 1,4 (5,8)	< LOQ	2,4 ± 0,06 (2,5)
	1468	5,2 ± 0,2 (3,2)	5,2 ± 0,04 (0,8)	0,5 ± 0,004 (0,7)	18,9 ± 0,2 (1,1)	< LOQ	1,2 ± 0,002 (0,2)
	1476	3,7 ± 0,05 (1,3)	3,5 ± 0,6 (17,0)	0,6 ± 0,001 (0,2)	19,5 ± 0,3 (1,4)	< LOQ	2,6 ± 0,03 (1,20)
1480	3,5 ± 0,004 (0,01)	4,8 ± 0,02 (0,3)	0,3 ± 0,02 (7,9)	23,4 ± 0,1 (0,2)	< LOQ	2,6 ± 0,03 (1,2)	
1481	1,5 ± 0,09 (6,0)	9,9 ± 1,6 (16,0)	0,4 ± 0,03 (7,1)	16,0 ± 0,3 (2,0)	< LOQ	3,2 ± 0,1 (2,9)	
1493	2,5 ± 0,1 (4,6)	4,4 ± 0,1 (3,2)	0,6 ± 0,01 (0,8)	22,3 ± 1,2 (5,5)	< LOQ	1,1 ± 0,02 (1,6)	
1500	9,8 ± 0,06 (0,6)	17,8 ± 0,8 (4,7)	0,8 ± 0,02 (2,1)	22,9 ± 0,9 (3,8)	< LOQ	1,2 ± 0,05 (3,8)	
1502	2,5 ± 0,04 (1,6)	11,2 ± 0,6 (5,8)	0,3 ± 0,01 (2,4)	32,6 ± 0,7 (2,2)	< LOQ	2,6 ± 0,03 (1,3)	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	4,9 ± 0,1 (3,0)	5,5 ± 0,04 (0,8)	0,4 ± 0,03 (6,1)	37,1 ± 0,7 (1,9)	< LOQ	2,0 ± 0,1 (5,2)
	240	2,8 ± 0,1 (4,0)	6,3 ± 0,3 (4,2)	0,3 ± 0,003 (0,9)	23,0 ± 0,6 (2,7)	< LOQ	1,6 ± 0,03 (2,0)
	246	2,3 ± 0,3 (12,0)	8,7 ± 0,8 (8,8)	0,4 ± 0,004 (1,0)	32,0 ± 2,6 (8,0)	< LOQ	2,4 ± 0,2 (7,4)
	464	2,1 ± 0,07 (3,4)	8,5 ± 1,2 (14,0)	0,3 ± 0,02 (6,8)	27,7 ± 0,2 (0,9)	< LOQ	1,8 ± 0,03 (1,9)
	468	12,3 ± 0,2 (1,3)	40,4 ± 6,1 (15,0)	0,9 ± 0,002 (0,2)	25,8 ± 0,1 (0,2)	< LOQ	1,9 ± 0,03 (1,5)
	470	3,9 ± 0,2 (4,9)	8,9 ± 0,6 (6,5)	0,5 ± 0,01 (1,6)	15,1 ± 0,3 (2,1)	< LOQ	0,9 ± 0,05 (6,0)
	479	12,0 ± 0,5 (3,9)	19,7 ± 0,3 (1,3)	0,9 ± 0,05 (6,1)	22,0 ± 0,4 (2,0)	< LOQ	1,3 ± 0,06 (4,8)
	490	29,4 ± 1,1 (3,9)	52,6 ± 2,3 (4,4)	1,7 ± 0,06 (3,8)	27,6 ± 1,1 (3,9)	< LOQ	2,2 ± 0,1 (5,9)
	491	2,5 ± 0,0001 (0,01)	12,6 ± 0,2 (1,9)	0,4 ± 0,01 (3,6)	27,7 ± 0,6 (2,0)	< LOQ	2,1 ± 0,1 (6,6)
	494	5,2 ± 0,1 (2,4)	7,5 ± 0,2 (2,1)	0,6 ± 0,02 (3,9)	19,4 ± 0,01 (0,03)	< LOQ	1,1 ± 0,06 (5,6)
	499	8,1 ± 0,9 (11)	39,8 ± 0,6 (1,5)	0,7 ± 0,04 (5,5)	32,4 ± 2,4 (7,4)	< LOQ	3,1 ± 0,2 (5,6)
	516	11,6 ± 0,05 (0,5)	25,7 ± 0,5 (1,9)	0,6 ± 0,06 (9,3)	27,5 ± 0,2 (0,9)	< LOQ	2,3 ± 0,02 (1,1)
	520	2,2 ± 0,04 (1,9)	12,5 ± 0,2 (1,3)	0,4 ± 0,02 (6,1)	25,9 ± 0,3 (1,1)	< LOQ	0,9 ± 0,00001 (0,001)
	521	1,7 ± 0,06 (3,3)	5,7 ± 0,2 (2,9)	0,3 ± 0,03 (9,4)	26,3 ± 1,3 (4,8)	< LOQ	2,3 ± 0,03 (1,4)
	1462	10,5 ± 0,2 (2,2)	5,3 ± 0,03 (0,7)	0,9 ± 0,05 (4,8)	27,5 ± 0,1 (0,5)	< LOQ	1,3 ± 0,02 (1,6)
	1464	4,3 ± 0,02 (0,4)	12,2 ± 0,7 (6,1)	0,6 ± 0,02 (2,5)	19,2 ± 0,7 (3,8)	< LOQ	1,2 ± 0,01 (0,4)
	1479	8,2 ± 0,6 (7,7)	10,1 ± 0,8 (8,0)	0,8 ± 0,03 (3,6)	19,8 ± 0,5 (2,3)	< LOQ	1,1 ± 0,03 (3,0)
	1485	3,9 ± 0,2 (4,5)	9,9 ± 0,2 (2,2)	0,7 ± 0,01 (1,6)	20,8 ± 0,2 (1,1)	< LOQ	2,5 ± 0,1 (4,4)
	1494	2,4 ± 0,2 (7,2)	15,3 ± 1,5 (9,7)	0,5 ± 0,06 (13,0)	12,1 ± 1,2 (9,5)	< LOQ	1,1 ± 0,09 (7,9)
	1495	2,7 ± 0,1 (4,8)	21,9 ± 0,4 (1,8)	0,4 ± 0,03 (7,1)	29,0 ± 0,5 (1,6)	< LOQ	2,4 ± 0,05 (2,2)
	1496	2,8 ± 0,08 (2,9)	134,0 ± 12,7 (9,5)	0,7 ± 0,09 (13,0)	25,1 ± 1,3 (5,3)	< LOQ	4,6 ± 0,4 (7,9)
	1498	1,9 ± 0,07 (3,4)	7,1 ± 0,9 (12,0)	0,3 ± 0,03 (8,3)	26,1 ± 1,1 (4,0)	< LOQ	2,0 ± 0,02 (1,0)
	1501	2,8 ± 0,1 (4,8)	5,8 ± 0,4 (6,7)	0,3 ± 0,01 (4,0)	19,0 ± 1,0 (5,4)	< LOQ	1,90 ± 0,04 (2,0)
	1503	6,1 ± 0,2 (4,0)	5,9 ± 0,4 (7,3)	0,6 ± 0,02 (3,3)	19,0 ± 1,0 (5,4)	< LOQ	1,1 ± 0,1 (10,2)
	15	3,3 ± 0,04 (1,2)	9,5 ± 0,3 (2,9)	0,4 ± 0,03 (7,9)	23,6 ± 0,5 (2,0)	< LOQ	1,8 ± 0,03 (1,5)

4.2.2 Resultados para músculo

As frações de massa dos macro e micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de músculo determinadas por ICP OES estão apresentados na Tabela 15. Como mencionado no item 5.2., o teste *t* de Student e o teste de Mann-Whitney foram realizados para verificar se a havia diferença estatística entre as dietas.

Para o Ca foram observadas frações de massa média de 130 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta convencional e 144 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta com subprodutos. Como as amostras apresentaram distribuição não normal, o teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 278$, $p\text{-valor} = 0,14$), indicando que a fração de massa de Ca não é significativamente diferente entre os grupos.

Para o P, as médias foram de 9775 mg kg⁻¹ e 9611 mg kg⁻¹, respectivamente. De acordo com o teste *t* (teste $t = 0,91$, $p\text{-valor} = 0,36$), os dois grupos não eram significativamente diferentes. Para o Fe foram obtidas média de 36 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e média de 35 mg kg⁻¹ para amostras de animais submetidos à dieta com subprodutos. O teste de Mann-Whitney revelou que os grupos não eram significativamente diferentes ($W = 325$, $p\text{-valor} = 0,41$).

O K apresentou fração de massa média de 18100 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e massa média de 17600 mg kg⁻¹ para amostras de animais submetidos à dieta com subprodutos. O teste *t* revelou que os grupos eram significativamente diferentes (teste $t = 2,51$, $p\text{-valor} = 0,01$).

Para o Na foram obtidas frações de massa média de 2001 mg kg⁻¹ e 1891 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e de subprodutos, respectivamente. O teste *t* (teste $t = 1,44$, $p\text{-valor} = 0,16$) confirmou que não há diferença significativa entre os resultados dos dois grupos. O mesmo comportamento estatístico foi observado para Zn e S. O Zn apresentou fração de massa média de 114 e 117 mg kg⁻¹ e o S fração de massa média de 8476 e 8299 mg kg⁻¹, respectivamente para os grupos

submetidos à dieta convencional e com subprodutos, os valores de p foram 0,47 e 0,08.

Os resultados para Mg nas amostras de líquido ruminal apresentaram frações de massa médias de 1241 e 1230 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e com subprodutos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney revelou que os grupos não eram significativamente diferentes ($W = 328$, $p\text{-valor} = 0,43$).

As frações de massa dos micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de músculo determinados por ICP-MS estão apresentados na Tabela 16.

O Cu apresentou fração de massa média de 0,59 mg kg⁻¹ e 0,61 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta convencional e por subprodutos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 304$, $p\text{-valor} = 0,27$) e indicou que os grupos não são significativamente diferentes. O Mn, V, Cr, Co, Se e Mo apresentaram frações de massa abaixo dos limites de quantificação calculados.

Tabela 15. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de músculo determinadas por ICP OES.

Animal	Embrapa	Ca (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	S (g 100g ⁻¹)	Na (g 100g ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	140,1 ± 13,5 (9,6)	46,3 ± 0,7 (1,6)	0,9 ± 0,006 (0,6)	0,2 ± 0,005 (2,3)	< LOQ
	242	155,5 ± 5,4 (3,5)	29,0 ± 0,9 (3,4)	0,8 ± 0,008 (1,0)	0,2 ± 0,001 (0,3)	< LOQ
	244	108,0 ± 8,7 (8,0)	40,0 ± 1,7 (4,3)	0,8 ± 0,01 (1,7)	0,2 ± 0,005 (1,9)	< LOQ
	466	87,0 ± 4,2 (4,9)	39,5 ± 1,5 (3,8)	0,9 ± 0,01 (1,7)	0,2 ± 0,006 (3,5)	< LOQ
	474	139,4 ± 2,0 (1,4)	26,7 ± 0,1 (0,4)	0,8 ± 0,006 (0,7)	0,2 ± 0,004 (1,8)	< LOQ
	483	117,5 ± 26,8 (22,8)	49,4 ± 1,4 (2,8)	0,9 ± 0,003 (0,3)	0,2 ± 0,001 (0,3)	< LOQ
	492	61,9 ± 5,3 (8,5)	34,4 ± 0,6 (1,6)	0,8 ± 0,01 (1,2)	0,2 ± 0,001 (0,7)	< LOQ
	500	137,7 ± 0,6 (0,4)	46,0 ± 1,0 (2,3)	0,9 ± 0,008 (1,0)	0,2 ± 0,006 (2,9)	< LOQ
	502	160,1 ± 4,0 (2,5)	31,5 ± 0,8 (2,6)	0,8 ± 0,006 (0,8)	0,2 ± 0,003 (1,7)	< LOQ
	505	202,6 ± 44,3 (31,8)	43,4 ± 1,2 (2,8)	0,8 ± 0,008 (0,9)	0,2 ± 0,0002 (0,08)	< LOQ
	506	102,6 ± 8,2 (8,0)	33,8 ± 1,5 (4,6)	0,9 ± 0,002 (0,2)	0,2 ± 0,001 (0,6)	< LOQ
	510	149,5 ± 23,2 (15,5)	44,8 ± 0,001 (0,001)	0,8 ± 0,01 (1,7)	0,2 ± 0,006 (2,8)	< LOQ
	511	53,5 ± 1,9 (3,6)	41,8 ± 0,9 (2,1)	0,9 ± 0,003 (0,3)	0,2 ± 0,008 (4,7)	< LOQ
	514	142,3 ± 20,0 (14,0)	30,6 ± 0,3 (1,0)	0,9 ± 0,006 (0,6)	0,2 ± 0,003 (2,1)	< LOQ
	515	134,9 ± 1,7 (1,3)	27,5 ± 0,8 (3,0)	0,8 ± 0,005 (0,6)	0,2 ± 0,008 (3,7)	< LOQ
	517	135,8 ± 2,7 (2,0)	40,3 ± 0,8 (1,9)	0,8 ± 0,01 (1,6)	0,3 ± 0,008 (3,0)	< LOQ
	523	97,3 ± 2,3 (2,4)	22,6 ± 0,5 (2,3)	0,8 ± 0,004 (0,5)	0,2 ± 0,005 (3,0)	< LOQ
	1460	123,0 ± 8,9 (7,3)	32,9 ± 0,9 (3,1)	0,8 ± 0,007 (0,8)	0,2 ± 0,003 (1,5)	< LOQ
	1468	192,9 ± 35,4 (18,3)	43,3 ± 0,6 (1,5)	0,9 ± 0,008 (0,9)	0,2 ± 0,000 (0,1)	< LOQ
	1476	88,8 ± 0,06 (0,07)	39,6 ± 0,1 (0,4)	0,8 ± 0,005 (0,6)	0,2 ± 0,000 (0,09)	< LOQ
	1480	122,8 ± 3,9 (3,2)	26,4 ± 2,4 (9,0)	0,9 ± 0,009 (1,0)	0,1 ± 0,004 (2,7)	< LOQ
1481	103,5 ± 22,8 (22,1)	28,6 ± 3,1 (10,9)	0,9 ± 0,01 (1,5)	0,1 ± 0,008 (5,3)	< LOQ	
1493	105,9 ± 1,4 (1,4)	30,9 ± 1,0 (3,4)	0,9 ± 0,005 (0,5)	0,2 ± 0,002 (0,8)	< LOQ	
1500	219,3 ± 34,0 (15,5)	41,2 ± 1,6 (4,0)	0,8 ± 0,009 (1,1)	0,2 ± 0,005 (2,4)	< LOQ	
1502	185,6 ± 17,6 (9,5)	21,3 ± 0,8 (4,0)	0,8 ± 0,002 (0,3)	0,2 ± 0,004 (2,4)	< LOQ	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	111,4 ± 14,8 (13,3)	25,8 ± 0,6 (2,4)	0,8 ± 0,01 (1,1)	0,2 ± 0,002 (1,2)	< LOQ
	240	247,3 ± 35,0 (14,1)	25,2 ± 0,2 (0,7)	0,8 ± 0,008 (1,0)	0,2 ± 0,003 (2,2)	< LOQ
	246	142,5 ± 8,9 (6,3)	25,9 ± 0,4 (1,4)	0,9 ± 0,004 (0,4)	0,1 ± 0,003 (1,9)	< LOQ
	464	155,5 ± 7,2 (4,6)	26,9 ± 7,1 (26,3)	0,8 ± 0,03 (4,1)	0,2 ± 0,007 (4,5)	< LOQ
	468	160,6 ± 26,2 (16,3)	47,9 ± 2,7 (5,6)	0,8 ± 0,01 (1,3)	0,2 ± 0,001 (0,3)	< LOQ
	470	197,0 ± 20,3 (10,3)	48,0 ± 1,1 (2,3)	0,8 ± 0,003 (0,4)	0,2 ± 0,006 (2,9)	< LOQ
	479	202,6 ± 14,6 (7,2)	50,4 ± 0,2 (0,5)	0,7 ± 0,003 (0,4)	0,2 ± 0,001 (0,4)	< LOQ
	490	125,1 ± 19,2 (15,4)	36,7 ± 2,5 (6,8)	0,8 ± 0,01 (1,3)	0,2 ± 0,005 (2,7)	< LOQ
	491	100,8 ± 0,4 (0,3)	28,2 ± 0,6 (2,1)	0,9 ± 0,009 (1,0)	0,2 ± 0,002 (1,5)	< LOQ
	494	100,1 ± 31,4 (31,4)	34,9 ± 0,8 (2,2)	0,8 ± 0,009 (1,1)	0,2 ± 0,002 (0,9)	< LOQ
	499	110,1 ± 11,8 (10,7)	31,0 ± 3,0 (9,9)	0,9 ± 0,006 (0,7)	0,2 ± 0,007 (4,0)	< LOQ
	516	126,7 ± 4,4 (3,5)	40,4 ± 3,0 (7,3)	0,8 ± 0,002 (0,2)	0,2 ± 0,003 (1,4)	< LOQ
	520	152,3 ± 2,3 (1,5)	42,8 ± 0,9 (2,1)	0,8 ± 0,003 (0,4)	0,2 ± 0,004 (1,6)	< LOQ
	521	116,3 ± 6,9 (5,9)	24,3 ± 1,3 (5,2)	0,9 ± 0,02 (1,8)	0,2 ± 0,002 (1,2)	< LOQ
	1462	138,0 ± 0,9 (0,7)	37,5 ± 1,5 (4,1)	0,8 ± 0,01 (1,4)	0,2 ± 0,004 (2,1)	< LOQ
	1464	107,3 ± 7,5 (7,0)	30,8 ± 0,4 (1,2)	0,8 ± 0,006 (0,7)	0,2 ± 0,000 (0,2)	< LOQ
	1479	253,0 ± 1,3 (0,5)	47,2 ± 1,2 (2,6)	0,8 ± 0,01 (1,5)	0,2 ± 0,001 (0,3)	< LOQ
	1485	148,5 ± 5,7 (3,8)	32,5 ± 1,6 (4,9)	0,8 ± 0,01 (1,3)	0,2 ± 0,002 (0,9)	< LOQ
	1494	131,7 ± 4,7 (3,3)	36,1 ± 4,8 (13,3)	0,9 ± 0,01 (1,2)	0,2 ± 0,01 (5,9)	< LOQ
	1495	110,3 ± 4,2 (3,8)	25,4 ± 0,3 (1,3)	0,9 ± 0,01 (1,5)	0,2 ± 0,003 (1,8)	< LOQ
	1496	122,1 ± 28,4 (23,3)	20,1 ± 2,6 (12,9)	0,9 ± 0,007 (0,8)	0,2 ± 0,007 (4,2)	< LOQ
1498	143,9 ± 4,2 (2,9)	43,0 ± 0,9 (2,2)	0,9 ± 0,002 (0,3)	0,2 ± 0,001 (0,8)	< LOQ	
1501	187,7 ± 4,4 (2,3)	48,5 ± 1,8 (3,8)	0,8 ± 0,007 (0,9)	0,2 ± 0,004 (2,1)	< LOQ	
1503	79,8 ± 5,1 (6,5)	49,8 ± 0,6 (1,2)	0,8 ± 0,008 (1,0)	0,2 ± 0,005 (2,3)	< LOQ	
1504	155,8 ± 9,4 (6,1)	37,8 ± 0,6 (1,5)	0,9 ± 0,006 (0,7)	0,2 ± 0,005 (2,4)	< LOQ	

Tabela 15. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de músculo determinadas por ICP OES (continuação).

	Animal Embrapa	K (g 100g ⁻¹)	Mg (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	P (g 100g ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	1,7 ± 0,2 (1,1)	1130,4 ± 4,3 (0,4)	122,6 ± 0,1 (0,1)	0,9 ± 0,007 (0,8)
	242	1,9 ± 0,04 (2,3)	1443,9 ± 48,6 (3,4)	109,4 ± 2,9 (2,6)	1,1 ± 0,02 (1,7)
	244	1,8 ± 0,02 (1,1)	1586,4 ± 5,9 (0,4)	115,7 ± 0,2 (0,2)	1,1 ± 0,01 (1,2)
	466	1,8 ± 0,02 (1,1)	1069,2 ± 8,8 (0,8)	114,2 ± 1,2 (1,1)	0,9 ± 0,01 (1,1)
	474	1,8 ± 0,01 (0,7)	1394,5 ± 18,5 (1,3)	96,9 ± 0,6 (0,7)	0,9 ± 0,01 (1,0)
	483	1,8 ± 0,003 (0,2)	1435,3 ± 8,8 (0,6)	132,2 ± 0,2 (0,2)	1,0 ± 0,004 (0,4)
	492	1,8 ± 0,009 (0,5)	1159,1 ± 2,9 (0,2)	102,1 ± 0,9 (0,9)	1,0 ± 0,006 (0,6)
	500	1,8 ± 0,03 (1,5)	1160,4 ± 4,9 (0,4)	119,2 ± 1,9 (1,6)	1,0 ± 0,01 (1,2)
	502	1,7 ± 0,01 (0,7)	987,0 ± 7,7 (0,8)	101,2 ± 0,2 (0,2)	0,9 ± 0,008 (0,9)
	505	1,9 ± 0,03 (1,5)	1140,3 ± 11,8 (1,0)	112,0 ± 1,5 (1,4)	1,0 ± 0,01 (1,0)
	506	1,9 ± 0,04 (2,0)	1230,2 ± 76,3 (6,2)	120,5 ± 3,9 (3,3)	0,9 ± 0,04 (4,3)
	510	1,7 ± 0,006 (0,3)	1107,6 ± 4,9 (0,4)	121,5 ± 1,2 (1,0)	1,0 ± 0,002 (0,2)
	511	1,8 ± 0,01 (0,7)	1054,4 ± 1,4 (0,1)	124,6 ± 1,4 (1,1)	0,9 ± 0,004 (0,5)
	514	1,8 ± 0,01 (0,7)	1099,0 ± 4,5 (0,4)	125,7 ± 0,8 (0,7)	0,9 ± 0,01 (1,4)
	515	1,8 ± 0,007 (0,4)	1297,5 ± 15,8 (1,2)	115,9 ± 0,8 (0,7)	1,0 ± 0,003 (0,3)
	517	1,8 ± 0,05 (2,5)	1344,9 ± 124,8 (9,3)	129,5 ± 2,6 (2,0)	1,0 ± 0,01 (1,4)
	523	1,7 ± 0,008 (0,5)	964,6 ± 4,2 (0,4)	87,7 ± 0,9 (1,1)	0,9 ± 0,005 (0,6)
	1460	1,8 ± 0,02 (0,9)	1186,5 ± 18,5 (1,5)	112,8 ± 1,4 (1,2)	1,0 ± 0,01 (1,1)
	1468	1,9 ± 0,005 (0,3)	1518,9 ± 15,2 (1,0)	127,8 ± 1,0 (0,8)	1,0 ± 0,003 (0,3)
	1476	1,8 ± 0,02 (0,9)	1522,8 ± 4,6 (0,3)	125,2 ± 0,3 (0,2)	1,1 ± 0,01 (1,0)
1480	1,8 ± 0,02 (1,1)	990,9 ± 2,9 (0,3)	109,2 ± 1,8 (1,7)	1,0 ± 0,003 (0,3)	
1481	1,8 ± 0,02 (1,3)	1049,1 ± 29,9 (2,9)	99,1 ± 3,7 (3,8)	0,9 ± 0,009 (1,0)	
1493	1,9 ± 0,02 (0,8)	1471,8 ± 32,3 (2,2)	113,8 ± 0,8 (0,7)	0,9 ± 0,009 (1,0)	
1500	1,8 ± 0,02 (1,3)	1386,7 ± 34,6 (2,5)	136,3 ± 0,02 (0,01)	1,0 ± 0,01 (1,3)	
1502	1,7 ± 0,03 (1,8)	987,0 ± 7,7 (0,8)	90,0 ± 2,3 (2,6)	0,9 ± 0,01 (1,5)	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	1,7 ± 0,02 (1,4)	989,3 ± 7,2 (0,7)	106,2 ± 2,1 (1,9)	0,9 ± 0,01 (1,4)
	240	1,7 ± 0,02 (1,0)	1032,2 ± 9,7 (0,9)	86,9 ± 0,4 (0,5)	0,9 ± 0,008 (0,9)
	246	1,8 ± 0,01 (0,6)	1052,6 ± 2,4 (0,2)	108,5 ± 1,7 (1,6)	0,9 ± 0,007 (0,8)
	464	1,7 ± 0,05 (2,8)	1111,4 ± 28,3 (2,5)	94,6 ± 0,3 (0,3)	1,0 ± 0,002 (0,2)
	468	1,5 ± 0,01 (0,9)	1053,5 ± 17,0 (1,6)	98,0 ± 2,1 (2,2)	0,9 ± 0,008 (0,9)
	470	1,7 ± 0,002 (0,1)	1249,1 ± 24,8 (2,0)	1,37,4 ± 2,0 (1,4)	1,0 ± 0,007 (0,7)
	479	1,8 ± 0,009 (0,5)	1435,2 ± 18,4 (1,3)	142,5 ± 1,1 (0,8)	1,1 ± 0,008 (0,8)
	490	1,8 ± 0,01 (0,6)	1612,7 ± 41,0 (2,5)	127,7 ± 1,8 (1,4)	1,1 ± 0,008 (0,8)
	491	1,7 ± 0,01 (0,8)	1026,2 ± 1,0 (0,1)	112,3 ± 0,8 (0,7)	0,9 ± 0,004 (0,5)
	494	1,8 ± 0,01 (0,5)	1360,2 ± 18,1 (1,3)	111,4 ± 0,4 (0,3)	1,0 ± 0,006 (0,6)
	499	1,8 ± 0,02 (0,9)	1104,0 ± 17,4 (1,6)	111,5 ± 0,3 (0,3)	0,9 ± 0,02 (1,7)
	516	1,8 ± 0,01 (0,6)	1168,2 ± 7,6 (0,6)	120,4 ± 2,1 (1,7)	1,0 ± 0,003 (0,2)
	520	1,8 ± 0,01 (0,8)	1269,9 ± 32,5 (2,6)	118,2 ± 0,5 (0,4)	1,0 ± 0,005 (0,5)
	521	1,8 ± 0,05 (2,9)	1348,0 ± 19,7 (1,5)	122,9 ± 0,9 (0,8)	0,9 ± 0,01 (1,3)
	1462	1,8 ± 0,02 (1,3)	1304,9 ± 54,8 (4,2)	124,0 ± 2,2 (1,8)	1,0 ± 0,01 (0,9)
	1464	1,8 ± 0,006 (0,3)	1476,5 ± 5,7 (0,4)	117,3 ± 0,3 (0,3)	0,9 ± 0,003 (0,3)
	1479	1,7 ± 0,007 (0,4)	1418,9 ± 0,9 (0,06)	140,7 ± 2,7 (1,9)	1,0 ± 0,000 (0,05)
	1485	1,7 ± 0,04 (2,2)	1180,0 ± 25,1 (2,1)	121,7 ± 0,4 (0,3)	1,0 ± 0,01 (1,3)
	1494	1,8 ± 0,04 (2,4)	1128,2 ± 25,9 (2,3)	116,3 ± 5,1 (4,4)	1,0 ± 0,01 (1,0)
	1495	1,8 ± 0,02 (1,2)	1083,2 ± 11,4 (1,0)	86,3 ± 1,8 (2,1)	0,9 ± 0,01 (1,4)
	1496	1,9 ± 0,02 (1,2)	1437,7 ± 8,6 (0,6)	140,8 ± 1,4 (1,0)	1,0 ± 0,007 (0,7)
	1498	1,7 ± 0,009 (0,5)	1095,5 ± 0,7 (0,1)	115,1 ± 0,9 (0,8)	0,9 ± 0,02 (0,3)
	1501	1,7 ± 0,01 (0,8)	1148,7 ± 3,7 (0,3)	130,0 ± 1,8 (1,4)	1,0 ± 0,001 (0,1)
	1503	1,8 ± 0,01 (0,7)	1517,5 ± 27,5 (1,8)	140,5 ± 1,3 (0,9)	1,0 ± 0,006 (0,6)
	1504	1,7 ± 0,01 (0,7)	1053,4 ± 10,2 (1,0)	103,3 ± 1,1 (1,0)	0,9 ± 0,009 (0,9)

[R2] Comentário: Corrigir numeração das tabelas

[R3] Comentário: coorigir

Tabela 16. Frações de massa dos micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de músculo determinadas por ICP-MS.

	Animal Embrapa	V (mg kg ⁻¹)	Cr (mg kg ⁻¹)	Co (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Se (mg kg ⁻¹)	Mo (mg kg ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,4 ± 0,03 (7,6)	< LOQ	< LOQ
	242	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,05 (10,7)	< LOQ	< LOQ
	244	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,04 (6,0)	< LOQ	< LOQ
	466	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,1 (17,1)	< LOQ	< LOQ
	474	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,02 (3,9)	< LOQ	< LOQ
	483	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,06 (9,0)	< LOQ	< LOQ
	492	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,4 ± 0,02 (4,9)	< LOQ	< LOQ
	500	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,1 ± 0,07 (6,0)	< LOQ	< LOQ
	502	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,03 (4,2)	< LOQ	< LOQ
	505	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,01 (1,0)	< LOQ	< LOQ
	506	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,03 (4,1)	< LOQ	< LOQ
	510	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,02 (2,4)	< LOQ	< LOQ
	511	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,04 (7,6)	< LOQ	< LOQ
	514	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,4 ± 0,01 (3,6)	< LOQ	< LOQ
	515	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,01 (1,4)	< LOQ	< LOQ
	517	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,00 (0,4)	< LOQ	< LOQ
	523	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,3 ± 0,03 (7,8)	< LOQ	< LOQ
	1460	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,08 (12,5)	< LOQ	< LOQ
	1468	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,06 (10,6)	< LOQ	< LOQ
	1476	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,01 (1,8)	< LOQ	< LOQ
1480	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,03 (5,5)	< LOQ	< LOQ	
1481	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,01 (1,0)	< LOQ	< LOQ	
1493	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,04 (5,6)	< LOQ	< LOQ	
1500	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,01 (1,8)	< LOQ	< LOQ	
1502	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,00 (0,7)	< LOQ	< LOQ	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,9 ± 0,1 (15,3)	< LOQ	< LOQ
	240	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,01 (2,4)	< LOQ	< LOQ
	246	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,00 (0,3)	< LOQ	< LOQ
	464	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,4 ± 0,02 (5,3)	< LOQ	< LOQ
	468	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,4 ± 0,00 (0,4)	< LOQ	< LOQ
	470	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,04 (5,9)	< LOQ	< LOQ
	479	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,01 (1,5)	< LOQ	< LOQ
	490	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,02 (4,0)	< LOQ	< LOQ
	491	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,04 (5,2)	< LOQ	< LOQ
	494	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,4 ± 0,01 (2,6)	< LOQ	< LOQ
	499	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,03 (4,5)	< LOQ	< LOQ
	516	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,01 (2,7)	< LOQ	< LOQ
	520	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,7 ± 0,05 (6,9)	< LOQ	< LOQ
	521	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,03 (4,7)	< LOQ	< LOQ
	1462	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,05 (7,2)	< LOQ	< LOQ
	1464	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,01 (2,3)	< LOQ	< LOQ
	1479	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,01 (1,6)	< LOQ	< LOQ
	1485	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,00 (0,7)	< LOQ	< LOQ
	1494	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,03 (4,6)	< LOQ	< LOQ
	1495	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,8 ± 0,04 (4,3)	< LOQ	< LOQ
1496	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,04 (6,2)	< LOQ	< LOQ	
1498	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,03 (5,8)	< LOQ	< LOQ	
1501	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,8 ± 0,1 (12,8)	< LOQ	< LOQ	
1503	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,01 (1,6)	< LOQ	< LOQ	
15	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,6 ± 0,02 (3,4)	< LOQ	< LOQ	

4.2.3 Resultados das fezes

As frações de massa dos macro e micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de fezes determinadas por ICP OES estão apresentados na Tabela 17.

A média das frações de massa das amostras do grupo de animais submetidos à dieta convencional foi de 13880 mg kg⁻¹ para o Ca, enquanto esse valor foi de 26810 mg kg⁻¹ para o grupo de animais submetidos à dieta com subprodutos, confirmado que são estatisticamente diferentes pelo teste de Mann-Whitney (p -valor = 3,27 10⁻¹⁰).

Os resultados para Fe alcançaram as médias de 1088 e 1726 mg kg⁻¹ para amostras de animais submetidos à dieta convencional e de subprodutos, respectivamente. De acordo com o teste de Mann-Whitney os grupos são significativamente diferentes ($W = 127$, p -valor = 5,85 10⁻⁵).

Para o S foram obtidas frações de massa média de 3497 mg kg⁻¹ e 4754 mg kg⁻¹ para animais submetidos à dieta convencional e à dieta com subprodutos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney revelou que os grupos são significativamente diferentes ($W = 141$, p -valor = 1,61 10⁻⁴).

As frações de massa média do Na foram de 6112 e 3579 mg kg⁻¹ para os dois grupos, respectivamente. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes (teste $t = -3,47$, p -valor = 0,001), com fração de massa superior em amostras baseadas na dieta convencional.

Para o Mn obteve-se fração de massa média de 132 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta convencional e 163 mg kg⁻¹ para o grupo de animais submetidos à dieta com subprodutos. De acordo com o teste de Mann-Whitney os grupos são significativamente diferentes ($W = 122$, p -valor = 4,16 10⁻⁵).

As frações de massa do K foram de 13800 e 10000 mg kg⁻¹ para os respectivos grupos e o teste t confirmou a diferença significativa entre os grupos (teste $t = 4,3$, p -valor = 7,88 10⁻⁵), com maior fração de massa apresentada para o grupo de animais submetidos à dieta convencional.

Frações de massa média de 2274 e 3684 mg kg⁻¹ foram obtidas para o Mg para os grupos avaliados. O teste *t* confirmou a diferença significativa entre os grupos (teste $t = -11,74$, $p\text{-valor} = 5,59 \cdot 10^{-16}$). Para o Zn, a média das frações de massa dos grupos foi de 111 e 159 mg kg⁻¹, respectivamente, sendo estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney ($W = 30$, $p\text{-valor} = 9,13 \cdot 10^{-9}$).

O P apresentou frações de massa média de 3893 e 7320 mg kg⁻¹ para os dois grupos avaliados e, de acordo com a avaliação estatística há diferença significativa entre estes (teste $t = -9,40$; $p\text{-valor} = 1,22 \cdot 10^{-12}$).

As frações de massa dos micronutrientes (média \pm desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de fezes determinadas por ICP-MS estão apresentados na Tabela 18.

Para o V foram observadas frações de massa média de 2,41 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta convencional e 5,09 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta com subprodutos. Como as amostras apresentaram distribuição não normal, um teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 68,5$, $p\text{-valor} = 4,26 \cdot 10^{-7}$), indicando que a fração de massa de V é significativamente diferente entre os grupos.

O Cr apresentou frações de massa média de 4,86 mg kg⁻¹ e 8,90 mg kg⁻¹ em amostras de fezes de animais submetidos à dieta convencional e por subprodutos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi realizado ($W = 170$, $p\text{-valor} = 0,001$) e indicou que os grupos são significativamente diferentes.

Para o Co, as médias foram de 0,81 mg kg⁻¹ e 1,06 mg kg⁻¹, respectivamente. De acordo com teste de Mann-Whitney ($W = 152$, $p\text{-valor} = 0,0003$), os dois grupos eram significativamente diferentes. O mesmo foi observado para o Cu, que apresentou frações de massa média de 17,04 e 31,79 mg kg⁻¹, respectivamente para os grupos submetidos à dieta convencional e com subprodutos, e valor de $p = 0,0001$.

Para o Mo foram observadas frações de massa média de 1,11 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta convencional e 1,14 mg kg⁻¹ para os animais submetidos à dieta com subprodutos. O teste de Mann-Whitney foi

realizado (mannw = 318, *p*-valor = 0,36) e indicou que os grupos não são significativamente diferentes. O Se apresentou frações de massa abaixo do limite de quantificação calculado.

Tabela 17. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de fezes determinadas por ICP OES.

Animal	Embrapa	Ca (g 100g ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	S (mg kg ⁻¹)	Na (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	1,4 ± 0,007 (0,5)	999,0 ± 83,7 (8,4)	2731,6 ± 95,8 (3,5)	5231,2 ± 62,0 (1,2)	126,7 ± 4,2 (3,3)
	242	1,4 ± 0,06 (4,0)	1219,1 ± 24,2 (2,0)	5782,4 ± 185,7 (3,2)	2670,3 ± 93,9 (3,5)	140,4 ± 4,3 (3,1)
	244	1,2 ± 0,05 (3,9)	993,0 ± 27,9 (2,8)	2416,8 ± 41,8 (1,7)	3001,4 ± 93,8 (3,1)	112,5 ± 3,5 (3,1)
	466	1,3 ± 0,06 (4,3)	746,3 ± 39,3 (5,3)	2698,4 ± 161,5 (6,0)	3976,0 ± 115,8 (2,9)	121,5 ± 3,9 (3,2)
	474	1,2 ± 0,08 (6,9)	910,7 ± 34,5 (3,8)	2700,2 ± 38,7 (1,4)	2121,4 ± 16,7 (0,8)	120,8 ± 3,2 (2,6)
	483	1,5 ± 0,07 (4,4)	1296,2 ± 26,0 (2,0)	2503,4 ± 23,8 (0,9)	8461,6 ± 527,9 (6,2)	141,1 ± 1,6 (1,1)
	492	1,3 ± 0,02 (1,7)	1155,3 ± 49,9 (4,3)	3465,6 ± 63,6 (1,8)	11664,6 ± 73,5 (0,6)	142,9 ± 1,9 (1,3)
	500	1,3 ± 0,09 (6,9)	1045,7 ± 44,8 (4,3)	2939,8 ± 144,8 (4,9)	5329,2 ± 36,0 (0,7)	112,5 ± 3,5 (3,1)
	502	1,6 ± 0,05 (3,1)	811,9 ± 23,5 (2,9)	5242,2 ± 27,4 (0,5)	11566,7 ± 49,5 (0,4)	135,7 ± 1,9 (1,4)
	505	0,9 ± 0,00005 (0,01)	1223 ± 11,9 (1,0)	4670,8 ± 12,9 (0,3)	5950,3 ± 27,9 (0,5)	113,2 ± 0,3 (0,2)
	506	1,4 ± 0,03 (2,1)	1485,2 ± 74,6 (5,0)	2437,4 ± 17,7 (0,7)	3581,6 ± 48,1 (1,3)	144,3 ± 1,9 (1,3)
	510	1,5 ± 0,01 (1,0)	1180,1 ± 27,4 (2,3)	5651,9 ± 53,8 (1,0)	7453,4 ± 11,1 (0,1)	149,3 ± 0,7 (0,4)
	511	1,6 ± 0,06 (3,9)	1704,1 ± 55,5 (3,3)	5680,0 ± 146,6 (2,6)	2177,3 ± 53,1 (2,4)	132,3 ± 3,2 (2,4)
	514	1,3 ± 0,06 (4,8)	1797,1 ± 61,7 (3,4)	2946,8 ± 125,6 (4,3)	5787,5 ± 86,1 (1,5)	176,4 ± 2,5 (1,4)
	515	1,4 ± 0,04 (3,1)	1797,1 ± 61,7 (3,4)	4652,7 ± 98,5 (2,1)	9637,7 ± 173,1 (1,8)	130,3 ± 4,3 (3,3)
	517	1,4 ± 0,03 (2,4)	970,1 ± 63,2 (6,5)	2433,2 ± 60,2 (2,5)	14178,8 ± 83,1 (0,6)	124,4 ± 2,8 (2,2)
	523	1,3 ± 0,1 (10)	768,6 ± 19,2 (2,5)	2014,8 ± 24,6 (1,2)	6971,6 ± 720,4 (10)	129,0 ± 3,8 (3,0)
	1460	1,3 ± 0,08 (6,1)	1001,3 ± 4,9 (0,5)	3702,1 ± 58,2 (1,6)	7288,3 ± 39,5 (0,5)	158,7 ± 1,1 (0,7)
	1468	1,4 ± 0,06 (4,5)	795,4 ± 25,6 (3,2)	2637,9 ± 32,6 (1,2)	3576,5 ± 259,2 (7,2)	113,8 ± 4,8 (4,2)
	1476	1,6 ± 0,02 (1,4)	1046,8 ± 26,2 (2,5)	2293,5 ± 40,9 (1,8)	3075,1 ± 22,0 (0,7)	107,3 ± 1,8 (1,7)
1480	1,4 ± 0,03 (2,0)	1485,4 ± 39,3 (2,6)	5139,5 ± 60,8 (1,2)	6587,3 ± 52,6 (0,8)	135,8 ± 1,1 (0,8)	
1481	1,5 ± 0,03 (1,8)	999,7 ± 35,7 (3,6)	2385,7 ± 36,7 (1,5)	6613,4 ± 167,7 (2,5)	118,4 ± 1,4 (1,2)	
1493	1,6 ± 0,03 (1,8)	962,6 ± 8,3 (0,9)	2684,3 ± 16,2 (0,6)	8330,8 ± 110,2 (1,3)	143,1 ± 1,2 (0,8)	
1500	1,5 ± 0,04 (2,6)	1045,7 ± 44,8 (4,3)	5159,0 ± 26,9 (0,5)	3224,7 ± 27,1 (0,8)	144,2 ± 1,5 (1,0)	
1502	1,4 ± 0,03 (2,5)	1489,9 ± 99,5 (6,7)	2530,4 ± 51,6 (2,0)	6434,5 ± 205,6 (3,2)	139,0 ± 3,2 (2,3)	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	2,7 ± 0,2 (6,4)	1469,5 ± 37,2 (2,5)	6202,1 ± 60,6 (1,0)	1100,0 ± 4,3 (0,4)	191,4 ± 2,4 (1,2)
	240	2,1 ± 0,2 (8,3)	2039,3 ± 49,0 (2,4)	6990,9 ± 322,0 (4,6)	452,9 ± 15,5 (3,4)	144,2 ± 4,3 (3,0)
	246	3,2 ± 0,02 (0,7)	4372,6 ± 81,3 (1,9)	4012,4 ± 39,9 (1,0)	3842,8 ± 119,4 (3,1)	260,0 ± 4,0 (1,5)
	464	2,7 ± 0,1 (3,7)	1471,2 ± 93,6 (6,4)	3477,2 ± 55,3 (1,6)	3178,1 ± 172,9 (5,4)	173,6 ± 3,4 (1,9)
	468	2,2 ± 0,004 (0,2)	1786,1 ± 76,2 (4,3)	6231,9 ± 223,1 (3,6)	6037,4 ± 250,4 (4,1)	123,8 ± 5,7 (4,6)
	470	2,6 ± 0,2 (6,5)	1371,7 ± 48,4 (3,5)	3860,8 ± 47,5 (1,2)	2949,2 ± 227,3 (7,7)	186,7 ± 2,5 (1,3)
	479	3,0 ± 0,1 (3,7)	1400,3 ± 46,9 (3,4)	3603,8 ± 121,0 (3,4)	3475,1 ± 147,3 (4,2)	153,9 ± 8,0 (5,2)
	490	3,1 ± 0,1 (4,2)	1283,0 ± 9,5 (0,7)	3734,2 ± 102,7 (2,8)	2304,8 ± 195,2 (8,5)	177,3 ± 6,3 (3,5)
	491	1,9 ± 0,05 (2,7)	1057,4 ± 44,2 (4,2)	5932,2 ± 83,4 (1,4)	2588,9 ± 59,2 (2,3)	121,0 ± 2,5 (2,1)
	494	2,5 ± 0,04 (1,6)	1317,4 ± 32,5 (2,5)	2941,5 ± 55,7 (1,9)	4510,9 ± 127,6 (2,8)	141,8 ± 2,4 (1,7)
	499	2,9 ± 0,2 (7,7)	1368,2 ± 61,6 (4,5)	6340,7 ± 108,7 (1,7)	855,6 ± 21,4 (2,5)	195,4 ± 4,4 (2,2)
	516	2,4 ± 0,1 (4,6)	4645,1 ± 289,7 (6,2)	3249,8 ± 9,1 (0,3)	1260,2 ± 71,6 (5,7)	178,4 ± 5,3 (3,0)
	520	2,1 ± 0,04 (2,2)	868,4 ± 3,7 (0,4)	6271,1 ± 128,2 (2,0)	7389,5 ± 138,4 (1,9)	108,5 ± 1,7 (1,6)
	521	2,4 ± 0,2 (9,3)	2108,7 ± 27,9 (1,3)	3290,7 ± 54,6 (1,7)	9046,2 ± 118,0 (1,3)	142,4 ± 23,3 (16,3)
	1462	2,7 ± 0,04 (1,6)	1155,7 ± 66,1 (5,7)	5547,3 ± 33,6 (0,6)	1889,1 ± 48,3 (2,6)	142,1 ± 4,6 (3,2)
	1464	2,5 ± 0,04 (1,4)	2608,2 ± 127,9 (4,9)	3653,2 ± 15,8 (0,4)	6563,2 ± 253,5 (3,9)	180,2 ± 3,6 (2,0)
	1479	2,5 ± 0,07 (2,9)	1503,6 ± 38,0 (2,5)	4980,5 ± 197,0 (4,0)	3161,8 ± 78,6 (2,5)	165,7 ± 4,6 (2,8)
	1485	2,5 ± 0,3 (11)	1362,1 ± 63,9 (4,7)	3202,4 ± 762,5 (23,8)	4628,7 ± 44,7 (1,0)	174,4 ± 1,0 (0,6)
	1494	2,7 ± 0,04 (1,3)	2439,3 ± 111,0 (4,5)	6902,5 ± 66,7 (1,0)	6566,4 ± 49,3 (0,8)	152,8 ± 1,9 (1,3)
	1495	3,0 ± 0,08 (2,7)	1453,2 ± 46,6 (3,2)	6176,4 ± 130,5 (2,1)	1689,8 ± 19,3 (1,1)	177,4 ± 6,0 (3,4)
1496	3,9 ± 0,1 (3,5)	1295,6 ± 23,8 (1,8)	5575,8 ± 113,8 (2,0)	3957,7 ± 35,2 (0,9)	185,7 ± 1,5 (0,8)	
1498	3,2 ± 0,02 (0,6)	1002,6 ± 26,6 (2,7)	5816,8 ± 61,3 (1,1)	1389,7 ± 21,5 (1,5)	170,0 ± 2,5 (1,5)	
1501	2,1 ± 0,04 (2,0)	1432,2 ± 51,4 (3,6)	2736,0 ± 22,0 (0,8)	3557,8 ± 87,6 (2,5)	126,8 ± 2,3 (1,8)	
1503	2,9 ± 0,04 (1,5)	1615,0 ± 62,8 (3,9)	3663,2 ± 46,3 (1,3)	4345,9 ± 64,8 (1,5)	169,4 ± 2,1 (1,3)	
1504	3,2 ± 0,04 (1,4)	1387,9 ± 59,5 (4,3)	3736,9 ± 35,2 (0,9)	4469,5 ± 132,4 (3,0)	167,6 ± 0,6 (0,4)	

Tabela 17. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de fezes determinadas por ICP OES (continuação).

	Animal Embrapa	K (g 100g ⁻¹)	Mg (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	2,2 ± 0,07 (3,3)	2237,9 ± 64,3 (2,9)	109,1 ± 3,5 (3,2)	4239,9 ± 50,9 (1,2)
	242	1,1 ± 0,04 (3,5)	2192,9 ± 58,2 (2,7)	121,4 ± 3,6 (3,0)	3517,3 ± 109,4 (3,1)
	244	1,5 ± 0,05 (3,3)	1962,5 ± 54,1 (2,8)	88,2 ± 2,5 (2,8)	3554,7 ± 109,6 (3,1)
	466	1,4 ± 0,05 (3,2)	2495,8 ± 60,9 (2,4)	112,2 ± 2,9 (2,6)	4157,2 ± 112,4 (2,7)
	474	0,9 ± 0,02 (2,4)	2412,7 ± 40,7 (1,7)	108,9 ± 2,0 (1,8)	3559,6 ± 12,5 (0,3)
	483	1,7 ± 0,02 (1,4)	2465,5 ± 16,3 (0,7)	108,8 ± 0,5 (0,5)	3808,5 ± 237,3 (6,2)
	492	1,4 ± 0,01 (1,0)	2105,3 ± 23,0 (1,1)	124,8 ± 1,8 (1,4)	3403,7 ± 36,5 (1,1)
	500	1,5 ± 0,01 (1,0)	1783,5 ± 31,5 (1,8)	95,6 ± 2,1 (2,2)	4053,2 ± 73,5 (1,8)
	502	1,6 ± 0,006 (0,4)	2066,8 ± 9,3 (0,4)	120,3 ± 0,4 (0,3)	3618,8 ± 20,4 (0,6)
	505	1,0 ± 0,005 (0,5)	1865,6 ± 5,1 (0,3)	87,9 ± 0,4 (0,5)	2346,0 ± 12,1 (0,5)
	506	1,1 ± 0,02 (1,5)	2716,2 ± 35,5 (1,3)	121,0 ± 1,6 (1,3)	4453,7 ± 65,7 (1,5)
	510	1,4 ± 0,01 (0,9)	2608,9 ± 1,8 (0,1)	122,7 ± 0,3 (0,3)	3287,9 ± 7,2 (0,2)
	511	1,4 ± 0,04 (3,1)	2424,9 ± 54,6 (2,3)	120,8 ± 2,7 (2,3)	3569,9 ± 92,3 (2,6)
	514	1,0 ± 0,02 (2,0)	2531,4 ± 27,8 (1,1)	157,7 ± 1,8 (1,1)	5062,9 ± 56,2 (1,1)
	515	1,1 ± 0,02 (2,0)	1888,1 ± 28,3 (1,5)	101,3 ± 2,1 (2,1)	3519,2 ± 58,1 (1,7)
	517	1,3 ± 0,02 (1,6)	2086,3 ± 47,1 (2,3)	107,6 ± 3,7 (3,4)	4313,6 ± 33,5 (0,8)
	523	1,2 ± 0,01 (1,2)	2436,9 ± 26,2 (1,1)	101,5 ± 2,6 (2,6)	3798,0 ± 395,1 (10,4)
	1460	1,5 ± 0,01 (0,6)	2614,2 ± 16,1 (0,6)	129,7 ± 1,0 (0,7)	4165,3 ± 22,0 (0,5)
	1468	1,4 ± 0,03 (1,9)	2127,2 ± 24,1 (1,1)	101,9 ± 1,4 (1,3)	2755,3 ± 200,9 (7,3)
	1476	1,1 ± 0,01 (1,2)	2262,0 ± 25,8 (1,1)	92,6 ± 1,1 (1,2)	4115,7 ± 51,0 (1,2)
1480	1,5 ± 0,01 (0,9)	2109,7 ± 15,3 (0,7)	115,2 ± 1,0 (0,9)	4305,3 ± 24,4 (0,6)	
1481	1,4 ± 0,01 (1,1)	2455,9 ± 30,2 (1,2)	97,5 ± 1,1 (1,1)	4715,5 ± 94,5 (2,0)	
1493	2,2 ± 0,02 (0,9)	2386,8 ± 15,5 (0,7)	120,6 ± 0,6 (0,5)	4260,2 ± 64,9 (1,5)	
1500	1,2 ± 0,004 (0,4)	2412,9 ± 26,3 (1,1)	120,8 ± 1,4 (1,1)	3938,0 ± 33,4 (0,8)	
1502	1,8 ± 0,02 (0,8)	2245,5 ± 23,4 (1,0)	112,8 ± 1,7 (1,5)	4456,7 ± 96,9 (2,2)	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	0,7 ± 0,002 (0,3)	5255,9 ± 23,7 (0,5)	193,3 ± 2,0 (1,0)	7920,4 ± 75,0 (0,9)
	240	0,3 ± 0,02 (6,9)	3145,1 ± 105,0 (3,3)	142,3 ± 5,5 (3,9)	6389,2 ± 231,8 (3,6)
	246	0,6 ± 0,02 (2,7)	4178,1 ± 54,5 (1,3)	221,5 ± 3,7 (1,7)	8743,7 ± 224,5 (2,6)
	464	1,7 ± 0,03 (1,7)	3343,2 ± 40,4 (1,2)	170,9 ± 2,1 (1,2)	9972,8 ± 474,7 (4,8)
	468	1,2 ± 0,06 (5,2)	3062,6 ± 115,0 (3,8)	130,3 ± 5,8 (4,5)	6326,9 ± 278,1 (4,4)
	470	1,3 ± 0,01 (0,8)	3880,7 ± 30,2 (0,8)	180,4 ± 1,7 (0,9)	7477,5 ± 467,3 (6,2)
	479	1,0 ± 0,05 (4,7)	3861,7 ± 152,2 (3,9)	145,3 ± 7,6 (5,3)	10381,3 ± 525,5 (5,1)
	490	1,5 ± 0,04 (3,0)	4428,5 ± 83,0 (1,9)	171,9 ± 4,1 (2,4)	7756,3 ± 388,4 (5,0)
	491	0,6 ± 0,02 (3,1)	3414,2 ± 68,4 (2,0)	130,0 ± 2,7 (2,1)	5246,6 ± 101,8 (1,9)
	494	0,9 ± 0,01 (1,7)	3237,6 ± 51,2 (1,6)	141,8 ± 2,0 (1,4)	8011,7 ± 182,3 (2,3)
	499	0,8 ± 0,02 (2,7)	4560,4 ± 80,7 (1,8)	210,2 ± 4,7 (2,2)	5493,9 ± 115,3 (2,1)
	516	0,9 ± 0,004 (0,5)	3951,8 ± 12,4 (0,3)	144,9 ± 0,7 (0,5)	8907,3 ± 416,0 (4,7)
	520	0,9 ± 0,01 (1,7)	2405,8 ± 41,6 (1,7)	106,8 ± 2,4 (2,3)	4278,4 ± 109,2 (2,6)
	521	1,1 ± 0,1 (9,6)	3570,3 ± 278,1 (7,8)	136,0 ± 7,3 (5,3)	7918,5 ± 1120,6 (14,2)
	1462	0,8 ± 0,02 (3,2)	3411,2 ± 102,1 (3,0)	147,4 ± 5,1 (3,5)	5841,3 ± 181,4 (3,1)
	1464	0,8 ± 0,007 (0,9)	3383,7 ± 12,6 (0,4)	161,7 ± 1,5 (0,9)	9645,0 ± 331,2 (3,4)
	1479	1,2 ± 0,03 (2,6)	3675,8 ± 72,3 (2,0)	158,1 ± 4,5 (2,8)	6564,7 ± 174,6 (2,7)
	1485	0,8 ± 0,003 (0,4)	3766,4 ± 1,2 (0,03)	160,5 ± 0,0003 (0,0002)	5958,3 ± 1361,1 (22,8)
	1494	0,8 ± 0,01 (1,2)	3690,5 ± 13,7 (0,4)	149,8 ± 0,5 (0,3)	6212,8 ± 50,8 (0,8)
	1495	0,9 ± 0,02 (1,8)	3793,6 ± 39,1 (1,0)	168,0 ± 2,6 (1,5)	6141,9 ± 91,5 (1,5)
1496	1,4 ± 0,01 (0,9)	4132,2 ± 32,3 (0,8)	199,1 ± 1,7 (0,8)	6152,4 ± 55,7 (0,9)	
1498	0,9 ± 0,02 (1,9)	3620,6 ± 41,1 (1,1)	172,9 ± 2,1 (1,2)	6649,5 ± 92,8 (1,4)	
1501	1,1 ± 0,02 (1,8)	3110,7 ± 52,2 (1,7)	128,8 ± 1,6 (1,2)	6466,7 ± 164,5 (2,5)	
1503	1,0 ± 0,01 (1,0)	4003,2 ± 34,7 (0,9)	178,7 ± 0,8 (0,5)	10848,0 ± 142,7 (1,3)	
1504	1,6 ± 0,02 (1,1)	3578,3 ± 28,8 (0,8)	150,9 ± 1,0 (0,7)	9629,0 ± 230,0 (2,4)	

Tabela 18. Frações de massa dos macro e micronutrientes (média ± desvio padrão) e os desvios padrão relativos (%) das amostras de fezes determinadas por ICP OES.

	Animal Embrapa	V (mg kg ⁻¹)	Cr (mg kg ⁻¹)	Co (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Se (mg kg ⁻¹)	Mo (mg kg ⁻¹)
Animais submetidos a dieta convencional	238	1,7 ± 0,06 (3,3)	5,0 ± 0,2 (4,8)	0,6 ± 0,04 (6,9)	31,8 ± 0,08 (0,3)	< LOQ	0,8 ± 0,002 (0,3)
	242	3,3 ± 0,2 (5,4)	4,0 ± 0,1 (2,6)	0,6 ± 0,01 (1,2)	9,7 ± 0,07 (0,7)	< LOQ	1,0 ± 0,04 (4,1)
	244	2,2 ± 0,2 (7,6)	5,8 ± 1,0 (17,6)	0,9 ± 0,07 (8,0)	12,2 ± 0,02 (0,2)	< LOQ	1,2 ± 0,1 (8,6)
	466	1,6 ± 0,08 (5,4)	2,7 ± 0,04 (1,3)	0,8 ± 0,01 (0,7)	11,4 ± 0,1 (0,9)	< LOQ	0,9 ± 0,01 (0,6)
	474	1,9 ± 0,04 (1,9)	7,6 ± 0,2 (2,8)	2,3 ± 0,03 (1,1)	14,9 ± 0,07 (0,5)	< LOQ	3,0 ± 0,01 (0,2)
	483	2,6 ± 0,03 (1,3)	2,7 ± 0,05 (1,7)	0,6 ± 0,01 (1,2)	29,9 ± 1,1 (3,7)	< LOQ	0,3 ± 0,02 (7,7)
	492	2,4 ± 0,05 (2,0)	2,7 ± 0,07 (2,5)	0,9 ± 0,02 (2,6)	11,5 ± 0,1 (0,9)	< LOQ	1,0 ± 0,03 (2,9)
	500	1,4 ± 0,06 (3,9)	1,4 ± 0,1 (6,7)	0,6 ± 0,01 (2,1)	9,2 ± 0,3 (2,9)	< LOQ	0,8 ± 0,04 (4,8)
	502	1,6 ± 0,04 (2,4)	2,3 ± 0,02 (0,8)	0,7 ± 0,002 (0,3)	10,1 ± 0,001 (0,005)	< LOQ	1,0 ± 0,03 (3,3)
	505	3,2 ± 0,03 (1,0)	9,6 ± 0,4 (4,6)	0,6 ± 0,01 (1,0)	8,4 ± 0,1 (1,3)	< LOQ	1,0 ± 0,02 (1,6)
	506	3,4 ± 0,1 (4,3)	2,3 ± 0,2 (7,3)	0,5 ± 0,02 (2,8)	30,9 ± 0,03 (0,09)	< LOQ	0,9 ± 0,06 (6,9)
	510	2,1 ± 0,06 (2,9)	5,2 ± 0,03 (0,5)	0,6 ± 0,005 (0,7)	11,2 ± 0,2 (1,4)	< LOQ	1,1 ± 0,05 (4,8)
	511	1,4 ± 0,02 (1,3)	1,1 ± 0,05 (4,8)	0,7 ± 0,01 (1,1)	11,4 ± 0,2 (1,9)	< LOQ	1,2 ± 0,03 (2,4)
	514	4,7 ± 0,6 (13,2)	6,2 ± 0,1 (2,0)	1,4 ± 0,03 (2,1)	16,7 ± 0,2 (1,5)	< LOQ	1,6 ± 0,03 (1,8)
	515	3,9 ± 0,04 (0,9)	11,9 ± 0,06 (0,5)	0,6 ± 0,01 (1,5)	9,2 ± 0,01 (0,07)	< LOQ	1,3 ± 0,04 (3,0)
	517	2,0 ± 0,06 (3,1)	2,9 ± 0,01 (0,2)	0,5 ± 0,01 (1,3)	31,3 ± 1,6 (5,1)	< LOQ	0,2 ± 0,01 (5,9)
	523	1,3 ± 0,02 (1,6)	1,2 ± 0,2 (13,6)	0,4 ± 0,02 (4,0)	26,6 ± 0,5 (1,8)	< LOQ	0,4 ± 0,04 (9,1)
	1460	2,2 ± 0,03 (1,5)	4,4 ± 0,1 (2,9)	0,9 ± 0,001 (0,1)	11,8 ± 0,09 (0,7)	< LOQ	1,1 ± 0,03 (2,4)
	1468	2,1 ± 0,03 (1,5)	4,4 ± 2,0 (44,5)	0,8 ± 0,2 (22,1)	11,2 ± 1,9 (17,0)	< LOQ	1,0 ± 0,03 (3,3)
	1476	2,3 ± 0,09 (3,7)	2,4 ± 0,01 (0,4)	0,5 ± 0,002 (0,5)	24,3 ± 0,4 (1,8)	< LOQ	1,1 ± 0,2 (18,0)
1480	3,3 ± 0,04 (1,3)	17,3 ± 0,9 (5,2)	0,7 ± 0,003 (0,4)	11,2 ± 0,3 (2,3)	< LOQ	1,4 ± 0,05 (3,5)	
1481	1,9 ± 0,1 (7,0)	2,1 ± 0,04 (1,8)	0,4 ± 0,03 (6,4)	26,3 ± 0,1 (0,6)	< LOQ	0,8 ± 0,2 (29,9)	
1493	1,7 ± 0,06 (3,3)	5,0 ± 0,03 (0,6)	0,7 ± 0,04 (6,2)	32,4 ± 0,1 (0,4)	< LOQ	0,4 ± 0,05 (10,2)	
1500	1,9 ± 0,07 (3,4)	4,6 ± 0,3 (6,5)	0,7 ± 0,01 (2,0)	11,4 ± 0,04 (0,3)	< LOQ	1,1 ± 0,04 (3,9)	
1502	4,6 ± 0,09 (2,0)	7,9 ± 0,1 (1,6)	2,4 ± 0,02 (0,8)	17,2 ± 0,9 (5,0)	< LOQ	2,9 ± 0,2 (5,6)	
Animais submetidos a dieta com subprodutos	239	3,2 ± 0,2 (5,6)	4,3 ± 0,07 (1,6)	1,0 ± 0,03 (2,7)	19,6 ± 0,6 (3,1)	< LOQ	1,8 ± 0,1 (5,3)
	240	5,9 ± 0,1 (2,3)	5,8 ± 0,4 (6,9)	0,9 ± 0,002 (0,2)	15,8 ± 0,1 (0,7)	< LOQ	1,2 ± 0,1 (10,4)
	246	13,4 ± 0,2 (1,7)	21,1 ± 0,4 (1,8)	1,3 ± 0,05 (3,8)	74,9 ± 0,2 (0,3)	< LOQ	1,1 ± 0,03 (2,5)
	464	4,3 ± 0,07 (1,7)	4,8 ± 0,02 (0,4)	0,8 ± 0,02 (2,7)	51,7 ± 0,4 (0,7)	< LOQ	0,9 ± 0,09 (10,3)
	468	7,4 ± 0,2 (2,6)	4,9 ± 0,5 (3,1)	0,9 ± 0,03 (3,9)	13,8 ± 0,4 (2,6)	< LOQ	1,1 ± 0,08 (6,9)
	470	4,6 ± 0,06 (1,2)	7,5 ± 0,05 (0,7)	3,0 ± 0,02 (0,5)	26,9 ± 0,2 (0,7)	< LOQ	3,4 ± 0,01 (0,2)
	479	4,0 ± 0,05 (1,3)	4,0 ± 0,09 (2,1)	0,8 ± 0,001 (0,1)	48,7 ± 0,7 (1,4)	< LOQ	0,4 ± 0,02 (4,3)
	490	3,6 ± 0,03 (0,7)	12,2 ± 0,2 (1,6)	0,9 ± 0,0003 (0,03)	54,2 ± 0,7 (1,3)	< LOQ	0,5 ± 0,01 (1,4)
	491	2,5 ± 0,07 (2,9)	6,3 ± 0,2 (3,9)	0,6 ± 0,02 (3,0)	13,9 ± 0,4 (2,8)	< LOQ	0,8 ± 0,02 (1,9)
	494	3,4 ± 0,08 (2,3)	4,3 ± 0,3 (7,2)	0,7 ± 0,02 (3,4)	43,1 ± 0,3 (0,8)	< LOQ	0,4 ± 0,06 (15,6)
	499	3,8 ± 0,01 (0,4)	2,6 ± 0,06 (2,2)	1,1 ± 0,005 (0,4)	20,6 ± 0,5 (2,3)	< LOQ	1,3 ± 0,07 (5,1)
	516	13,1 ± 0,6 (4,8)	25,6 ± 0,2 (0,9)	1,2 ± 0,04 (3,5)	51,7 ± 0,9 (1,8)	< LOQ	0,2 ± 0,02 (8,6)
	520	4,3 ± 0,1 (2,6)	7,0 ± 0,2 (4,5)	0,9 ± 0,004 (0,4)	23,7 ± 0,2 (1,2)	< LOQ	1,2 ± 0,04 (3,4)
	521	6,4 ± 0,3 (5,1)	11,50 ± 0,4 (3,1)	0,7 ± 0,02 (2,7)	41,4 ± 1,9 (4,6)	< LOQ	0,3 ± 0,02 (5,9)
	1462	3,0 ± 0,01 (0,5)	4,3 ± 0,6 (14,6)	0,9 ± 0,001 (0,1)	15,6 ± 0,03 (0,2)	< LOQ	1,2 ± 0,00 (0,09)
	1464	8,4 ± 0,2 (1,9)	17,1 ± 0,7 (4,0)	0,8 ± 0,01 (1,4)	49,0 ± 0,5 (0,9)	< LOQ	0,8 ± 0,05 (5,9)
	1479	4,5 ± 0,01 (0,1)	6,3 ± 0,5 (8,4)	1,0 ± 0,05 (4,7)	17,8 ± 0,9 (5,2)	< LOQ	1,3 ± 0,02 (1,6)
	1485	3,7 ± 0,09 (2,4)	12,6 ± 0,1 (0,7)	2,7 ± 0,1 (4,9)	21,9 ± 0,4 (1,9)	< LOQ	3,5 ± 0,04 (1,3)
	1494	6,7 ± 0,3 (4,1)	10,9 ± 0,2 (1,5)	0,9 ± 0,001 (0,1)	15,7 ± 0,06 (0,4)	< LOQ	1,6 ± 0,05 (2,9)
	1495	4,0 ± 0,07 (1,8)	5,0 ± 0,1 (3,0)	1,0 ± 0,01 (0,7)	16,6 ± 0,1 (0,9)	< LOQ	1,3 ± 0,04 (3,4)
	1496	4,3 ± 0,1 (2,3)	5,4 ± 0,1 (1,2)	1,3 ± 0,05 (3,5)	21,3 ± 0,2 (0,9)	< LOQ	1,4 ± 0,01 (0,5)
	1498	2,7 ± 0,08 (3,1)	3,2 ± 0,4 (13,2)	1,0 ± 0,01 (0,6)	15,4 ± 0,4 (2,7)	< LOQ	1,1 ± 0,04 (3,9)
	1501	4,1 ± 0,2 (3,8)	7,3 ± 0,2 (3,3)	0,6 ± 0,01 (2,5)	39,6 ± 0,6 (0,7)	< LOQ	0,2 ± 0,02 (9,5)
	1503	4,6 ± 0,1 (2,5)	22,9 ± 1,2 (5,3)	0,9 ± 0,02 (2,5)	51,4 ± 0,3 (0,6)	< LOQ	0,9 ± 0,09 (9,4)
	1504	3,8 ± 0,05 (1,2)	9,0 ± 0,04 (0,5)	0,7 ± 0,001 (0,2)	47,1 ± 0,3 (0,6)	< LOQ	0,6 ± 0,02 (3,5)

4.3 Análise exploratória dos dados

4.3.1 Análise discriminante linear

O método de análise discriminante linear (LDA) foi aplicado para verificar os agrupamentos do conteúdo mineral para cada grupo (líquido ruminal, músculo e fezes).

A LDA é um método de redução de dimensionalidade parecido com a PCA, pois ambos procuram por combinações lineares de variáveis que melhor explicam os dados. Porém, a LDA tenta explicitar diferenças entre as classes de dados e projetam esses dados em um novo plano de forma que minimize a dispersão (variabilidade) dos dados dentro de cada classe e maximize a distância entre as médias dessas classes.

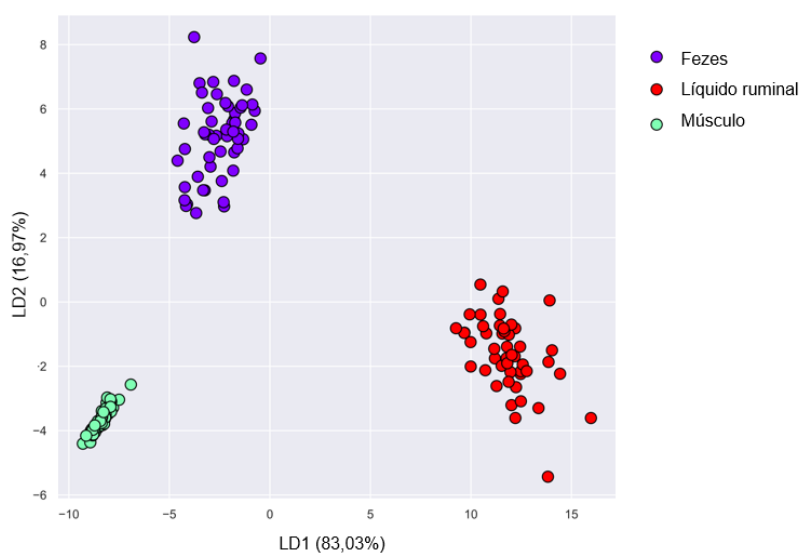


Figura 4. Gráfico de score LDA mostrando os agrupamentos do conteúdo de nutrientes inorgânicos para cada grupo.

[R4] Comentário: incluir o gráfico de loadings

Como podemos observar pela Figura 4, a LDA foi capaz de discriminar estes grupos com um score de 100% ($R^2=1$) e probabilidade de 100%, indicando que os mesmos são muito bem definidos e distintos, e que os teores de nutrientes são específicos para cada grupo.

4.3.2 Análise de componentes principais

O método de análise de componentes principais foi utilizado para verificar a dispersão de amostras e as tendências para os grupos de tratamentos (dieta convencional e dieta de subprodutos).

Para o líquido ruminal, foi construída uma matriz de dados com 52 linhas e 14 colunas, em que linhas representaram as amostras e as colunas as variáveis (Ca, Fe, S, Na, Mn, K, Mg, Zn, P, V, Cr, Co, Cu, Mo). Os dados foram auto-escalados devido à grande variação nas concentrações dos elementos. Após o pré-processamento dos dados, o programa Python versão 3 foi utilizado para gerar os gráficos de *scores* e *loadings*.

Os resultados obtidos da PCA (Figura 5 e 6) mostram que as duas primeiras componentes principais (PCs) são capazes de descrever 96,15% da variabilidade dos dados e 78,37% da variância total é descrita pela PC1, que contém informações de análise de variância mais altas. A variação restante provavelmente representa ruído, pois suas PCs não possuem cargas variáveis significativas.

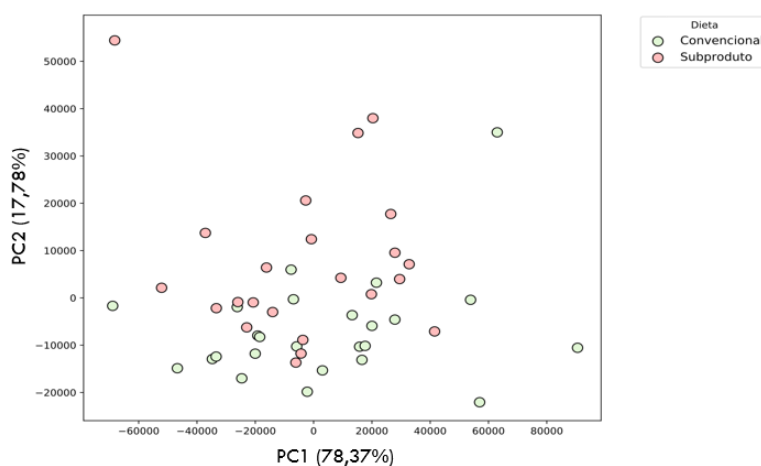


Figura 5. Gráfico de scores da PC1 x PC2 - líquido ruminal.

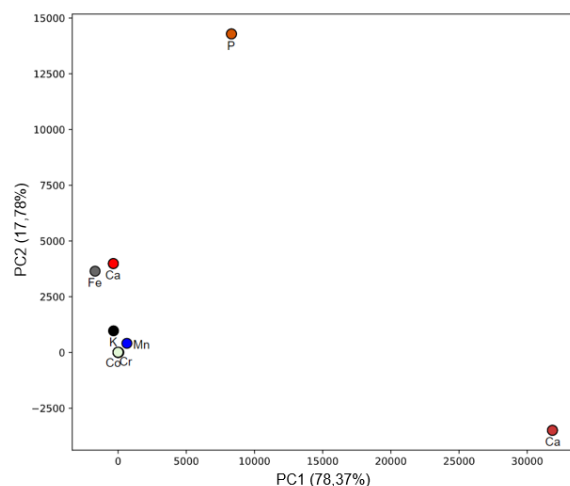


Figura 6. Gráfico de loadings da PC1 x PC2 - líquido ruminal.

Como demonstrado na Figura 5, não há separação dos grupos dos animais submetidos a dieta convencional e a dieta com subprodutos e eles se confundem.

Para o músculo, foi construída uma matriz de dados com 52 linhas e 9 colunas, em que linhas representaram as amostras e as colunas as variáveis (Ca, Fe, S, Na, K, Mg, Zn, P, Cu). O mesmo procedimento para o pré-tratamento dos dados descrito para o líquido ruminal foi aplicado.

Os resultados obtidos da PCA (Figura 7 e 8) mostram que as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) representam 67,65% e 24,57% da variância total, respectivamente. Como pode ser observado pelo gráfico de scores (Figura 7) nenhuma tendência à separação dos animais submetidos a dieta convencional e a dieta com subprodutos foi observada em PC1 ou PC2. Nesse caso, as amostras estão mais agrupadas, formando quase que um único grupo, isso possivelmente ocorre pois o músculo tem uma composição "conservada", ou seja, absorve apenas uma quantidade de nutriente necessária para sua manutenção, independente da dieta.

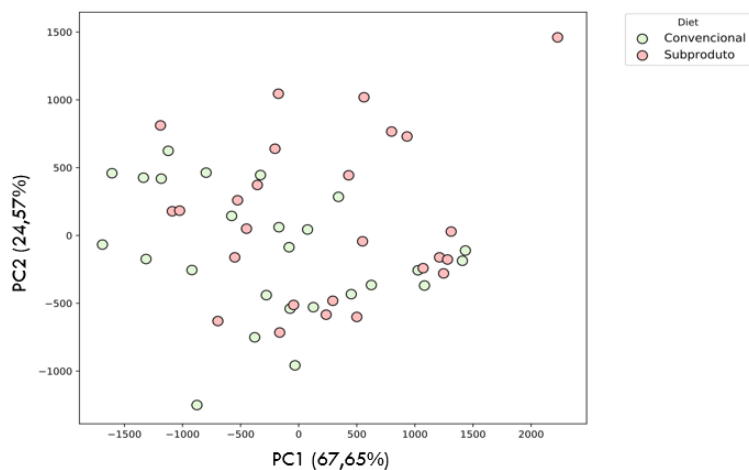


Figura 7. Gráfico de scores da PC1 x PC2 - músculo.

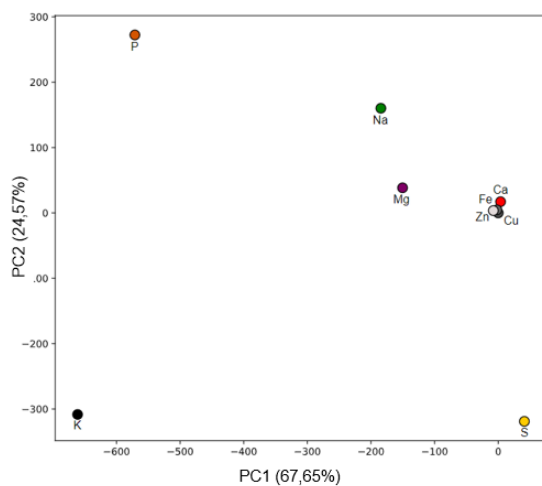


Figura 8. Gráfico de loadings da PC1 x PC2 – músculo.

Para as fezes, foi construída uma matriz de dados com 52 linhas e 14 colunas, em que linhas representaram as amostras e as colunas as variáveis (Ca, Fe, S, Na, Mn, K, Mg, Zn, P, V, Cr, Co, Cu e Mo) em colunas e as amostras em linhas. O mesmo procedimento para o pré-tratamento dos dados descrito para o líquido ruminal foi aplicado.

Os resultados obtidos da PCA (Figura 9 e 10) mostram que as duas PCs explicaram 88,91% da variância total dos dados. A primeira componente (PC1)

explica 73,08%, enquanto a segunda componente (PC2) corresponde a 15,83%. Por meio do gráfico de scores (Figura 9) é possível observar que houve uma separação nítida dos grupos dos animais submetidos a dieta convencional e a dieta com subprodutos. Isso ocorre porque os bovinos excretam aproximadamente 95% dos nutrientes ingeridos, como a absorção da maioria dos nutrientes foi maior na dieta com subprodutos, foi possível observar essa separação.

O grupo dos animais submetidos a dieta convencional tende a ficar no lado negativo da PC1, podendo ser relacionado com altas concentrações de Na e K e os submetidos a dieta com subprodutos do lado positivo da PC1, relacionados pela concentração de Ca, como pode ser observado nos *loadings* (Figura 10).

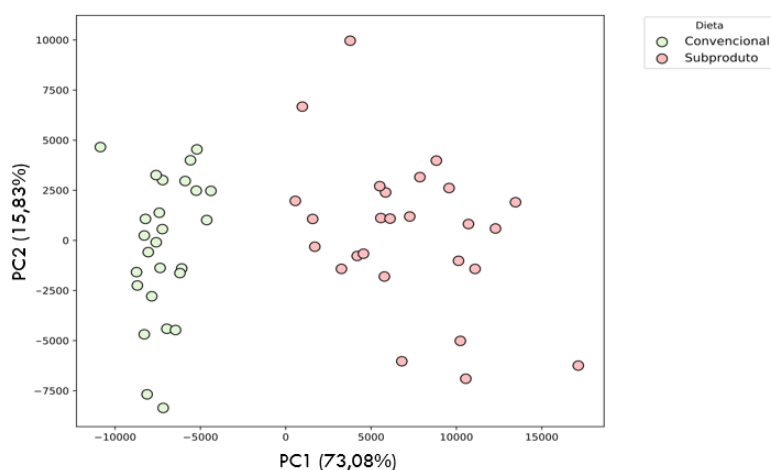


Figura 9. Gráfico de scores da PC1 x PC2 - fezes

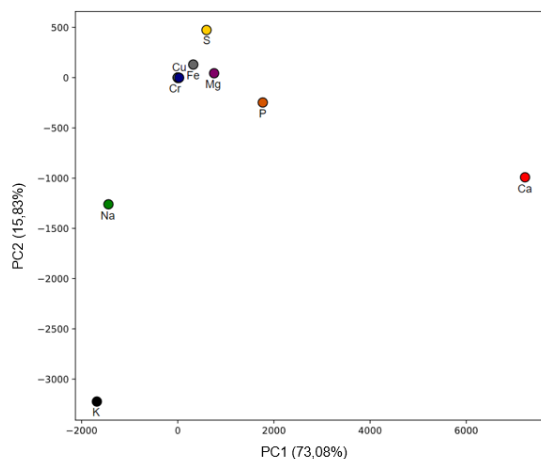


Figura 10. Gráfico de loadings da PC1 x PC2 – fezes.

4.3.3 Florestas randômicas classificatórias

Os dados também foram submetidos a modelos de florestas randômicas classificatórias para verificar se os teores dos nutrientes podem ser utilizados como preditores para grupo de tratamento (dieta convencional e dieta com subprodutos), estando, portanto, associado ao grupo. Caso possível, verificar quais analitos seriam os mais importantes para essa classificação (componentes que diminuiria a impureza das árvores).

Para isso, foi feita uma classificação polinomial utilizando modelos de RF, que é um consenso entre modelos de árvores de decisão. Árvores de decisão formam bifurcações, agrupando os dados de acordo com a redução da impureza dos grupos (Impureza de Gini – do inglês, Gini impurity), sendo o consenso da permutação destas árvores o método atual mais robusto para análise de dados.

O conjunto de dados foi dividido aleatoriamente, sendo 70% dos dados usados para treinar o modelo e 30% usados para testar seu desempenho. O modelo foi construído utilizando as opções `max_leaf_nodes=30`, `n_estimators=100`, `bootstrap=True`, `max_depth=20`, `max_features='auto'`, `n_jobs=-1`, `oob_score=True` e treinado com o conjunto de dados de treino.

Ao testarmos o conjunto de dados teste com o método de validação cruzada (do inglês - *Cross validation*), obtivemos os seguintes scores: 0,44; 0,63 e

1,0, respectivamente para músculo, líquido ruminal e fezes. A validação cruzada busca estimar o quão preciso é este modelo na prática.

Esses resultados mostraram que não é possível classificar as amostras utilizando os teores de nutrientes do músculo, pois a probabilidade de acerto é menor que 50%, ou seja, ao acaso. Isso, aliado ao gráfico de PCA apresentado anteriormente (Figura 4), permite concluir que não existe uma diferença significativa nos teores de nutrientes presente nos músculos entre os grupos de tratamentos. Um resultado similar foi observado nos teores de nutrientes presentes no líquido ruminal, onde a probabilidade de acerto pelo modelo é de 63%.

No entanto, esses resultados se apresentam diferentes quando avaliados os resultados obtidos nas amostras de fezes. Neste caso, os dados dos teores de nutrientes formaram dois grupos distintos no gráfico de PCA (Figura 5), linearmente separável e que apresentam uma probabilidade de acerto pelo modelo de 100%.

Como mencionado anteriormente, o modelo de floresta randômica classificatória também foi utilizado para verificar quais nutrientes que mais contribuíram para os modelos classificatórios, nesse caso, a métrica *Gini impurity* foi utilizada. Essa métrica geralmente é utilizada para quantificar quão boa é uma divisão.

Os valores dos *scores* apresentados na Tabela 19 são baseados no quanto os nutrientes reduzem a impureza das bifurcações das árvores de decisão. Quanto maior o ganho de Gini, menor é a impureza da árvore.

Para as fezes os elementos que mais contribuíram para os modelos classificatórios foram o P, Zn, Mg, Ca e K. Para o líquido ruminal os que mais contribuíram foram o Ca, V, Mg, Na, e Mn. Já para o músculo os elementos que mais contribuíram para essa classificação foram o Ca, Fe, Zn, S e K.

Tabela 19. Valores de scores obtidos através da métrica *Gini impurity*.

Analito	Score fezes	Score líq. ruminal	Score músculo
P	0,179	0,063	0,093
Zn	0,176	0,042	0,120
Mg	0,173	0,094	0,086
Ca	0,164	0,126	0,161
K	0,081	0,050	0,101
Mn	0,068	0,071	-
V	0,048	0,122	-
Cu	0,032	0,054	0,093
Fe	0,029	0,059	0,147
Co	0,014	0,067	-
Na	0,012	0,076	0,096
S	0,011	0,046	0,103
Mo	0,0	0,067	-
Cr	0,004	0,063	-

Conclusões

5. CONCLUSÕES

[R5] Comentário: rever de acordo com o novo objetivo.

O procedimento de preparo das amostras, incluindo as etapas de moagem, liofilização e digestão assistida por radiação micro-ondas em meio de ácido nítrico diluído foi efetivo para a decomposição das amostras de líquido ruminal, músculo e fezes de bovinos. O ICP OES e o ICP-MS mostraram-se adequados para a determinação de Ca, Mg, P, K, S, Na, Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Cr, Mo, Se e V nas amostras mencionadas, com exatidão e precisão necessárias.

Os dados de nutrientes indicaram diferenças significativas nas duas dietas avaliadas para Ca, P, Fe, Mn, Mg, Cr e V em amostras de fezes e líquido ruminal. As amostras de fezes também apresentaram diferenças significativas para o Na, Zn, S, Cu e Co. Nas amostras de músculo apenas o K apresentou diferença significativa nas duas dietas avaliadas.

A análise de discriminação linear foi capaz de discriminar os grupos (líquido ruminal, músculo e fezes), com um *score* de 100%, indicando que estes grupos são muito bem definidos e distintos. Nos gráficos de PCA apenas as fezes apresentaram uma separação clara dos grupos de tratamento (dieta convencional e com subprodutos).

Os resultados obtidos pelo modelo de florestas randômicas classificatórias indicaram que não é possível classificar as amostras utilizando os teores de nutrientes presentes no músculo e no líquido ruminal. Por outro lado, os dados dos teores de nutrientes presentes nas fezes formaram dois grupos claramente distintos, com probabilidade de acerto pelo modelo de 100%. Para as fezes os elementos que mais contribuíram para os modelos classificatórios foram o P, Zn, Mg, Ca e K. Para o líquido ruminal os que mais contribuíram foram o Ca, V, Mg Na, e Mn. Já para o músculo os elementos que mais contribuíram para essa classificação foram o Ca, Fe, Zn, S e K.

A disponibilidade desses resultados ampliará o volume e diversidade de dados gerados previamente pelo grupo de pesquisa em animais da raça Nelore, introduzindo uma nova fonte de informação às múltiplas camadas de dados genômicos (perfil de mRNA, de miRNA e proteômico do músculo, marcadores SNPs em alta densidade e sequenciamento genômico) devendo contribuir para o

aprofundamento do conhecimento acerca da relação entre microbiomas e características do hospedeiro.

Referências

6. REFERÊNCIAS

1. TEIXEIRA, J. C. & HESPANHOL, A. N. A trajetória da pecuária bovina brasileira. *Caderno Prudentino de Geografia*, 1 (36), 26-38, 2014.
2. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Indicadores do IBGE para produção pecuária. Disponível em https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisa/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=42. Acesso em 21 de janeiro de 2020.
3. NETO, R. C. S.; BERCHIN, I. I.; MAGTOTO, M.; BERCHIN, S.; XAVIER, W.G. & GUERRA, J. B. S. O. A. An integrative approach for the water-energy-food nexus in beef cattle production: A simulation of the proposed model to Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 204, 1108-1123, 2018.
4. ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Perfil da Pecuária no Brasil. Disponível em www.abiec.com.br. Acesso em 13 de julho de 2020.
5. OECD/FAO (2018), OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
6. WILDE, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 96, 240-249, 2006.
7. LAMB, G. C.; BROWN, D. R.; LARSON, J. E.; DAHLEN, C. R.; DILORENZO, N.; ARTHINGTON, J. D. & DICOSTANZO, A. Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation, and embryo production in superovulated angus heifers. *Animal Reproduction Science*, 106, 221- 231, 2008.
8. BINDARI, Y. R.; SHRESTHA, S.; SHRESTHA, N. & GAIRE, T. N. Effects of nutrition on reproduction-a review. *Advances in Applied Science Research*, 4, 421-429, 2013.
9. SHARMA, M. C.; JOSHI, C.; DAS, G. & HUSSAIN, K. Mineral nutrition and reproductive performace of the dairy animals: a review. *Indian Journal of Animal Science*, 77, 599-608, 2007.
10. ACNB, Associação dos Criadores de Nelore do Brasil. A raça. Disponível em <http://www.nelore.org.br/Raca>. Acesso em 21 de janeiro de 2020.
11. WRI, World Resources Institute. Como alimentar de forma sustentável 10 bilhões de pessoas até 2050, em 21 gráficos. Disponível em <https://www.wri.org/blog/2018/12/how-sustainably-feed-10-billion-people-2050-21-charts>. Acesso em 21 de janeiro de 2020.
12. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. “Serviço de Produção de Informação. Ciência para a vida: 25 anos da Embrapa”. Brasília, 1998. p. 105.
13. UNDERWOOD, E. J. & SUTTLE, N. F. “The Mineral Nutrition of Livestock”. 3 ed. Cambridge: CABI Publishing, 1999.
14. BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A. V. & OLIVEIRA, S. G. de. “Nutrição de ruminantes”. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 583.
15. QI, M.; WANG, P.; O'TOOLE, N.; BARBOZA, P. S.; UNGERFELD, E.; LEIGH, M. B.; SELINGER, L. B.; BUTLER, G.; TSANG, A.; MCALLISTER, T. A. & FORSTER, R. J. Snapshot of the eukaryotic gene expression in muskoxen rumen-a metatranscriptomic approach. *Plos One*, 6, 1-12, 2011.

16. KRAUSE, D.O.; NAGARAJA, T. G.; WRIGHT, A. D. G. & CALLAWAY, T. R. Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *Journal of Animal Science*, 91, 331-341, 2013.
17. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. "Nutrição mineral de bovinos de corte em pastejo: respostas de plantas forrageiras à adubação e de bovinos à suplementação da pastagem". São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. p. 57.
18. RUZIK, L. Speciation of challenging elements in food by atomic spectroscopy. *Talanta*, 93, 18-31, 2012.
19. SPEARS, J. W. Reevaluating of the metabolic essentiality of the minerals: review. *Journal of Animal Science*, 12, 1002-1008, 1999.
20. TIZIOTO, P. C.; GROMBONI, C. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; DE SOUZA, M. M.; MUDADU, M. A.; THOLON, P.; ROSA, A. N.; TULLIO, R. R.; MEDEIROS, S. R.; NASSU, R. T. & REGITANO, L. C. A. Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nellore cattle. *Meat Science*, 96, 436-440, 2014.
21. BALDASSINI, W. A.; BRAGA, C. P.; CHARDULO, L. A. L.; SILVA, J. A. V.; MALHEIROS, J. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; FERNANDES, T. T. & PADILHA, P. M. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). *Food Chemistry*, 169, 65-72, 2015.
22. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. "Importância da suplementação mineral para bovinos de corte". Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001.
23. AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H. & LEWIS, A. J. "Bioavailability of nutrients for animals amino acids, minerals, and vitamins". San Diego: Academic Press, 1995.
24. DINIZ, W. J. S.; COUTINHO, L. L.; TIZIOTO, P. C.; CESAR, A. S. M.; GROMBONI, C. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; DE OLIVEIRA, P. S. N.; DE SOUZA, M. M. & REGITANO, L. C. A. Iron Content Affects Lipogenic Gene Expression in the Muscle of Nelore Beef Cattle. *Plos One*, 11(8), 2016.
25. DAUNCEY M. J.; WHITE P.; BURTON K. A. & KATSUMATA M. Nutrition, hormone receptor expression and gene interactions: implications for development and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 63-72, 2001.
26. YASOTHAI, R. Importance of minerals on reproduction in dairy cattle. *International Journal of Science, Environment and Techonology*, 3, 2051-2057, 2014.
27. OVERTON, T. R. & YASUI, T. Practical applications of trace minerals for dairy cattle. *Journal of Animal Science*, 4, 2014.
28. SPEARS, J. W. & WEISS, W.P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176, 70-76, 2008.
29. HAYIRLI, A.; BREMMER, D. R.; BERTICS, S. J.; SOCHA, M. T. & GRUMMER, R. R. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84, 1218-1230, 2001.

30. MCNAMARA, J. P. & VALDEZ, F. Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate. *Journal of Dairy Science*, 88, 2498-2507, 2005.
31. DOMARADZKI, P.; FLOREK, M.; STASZOWSKA, A. & LITWIŃCZUK, Z. Evaluation of the Mineral Concentration in Beef from Polish Native Cattle. *Biological Trace Element Research*, 171(2), 328-332, 2015.
32. PILARCZYK, R. Concentrations of Toxic and Nutritional Essential Elements in Meat from Different Beef Breeds Reared under Intensive Production Systems. *Biological Trace Element Research*, 158(1), 36-44, 2014.
33. Rodríguez-MARÍN, N.; HARDISSON, A.; GUTIÉRREZ, Á. J.; LUIS-GONZÁLEZ, G.; GONZÁLEZ-WELLER, D.; RUBIO, C. & PAZ, S. Toxic (Al, Cd, and Pb) and trace metal (B, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr, and Zn) levels in tissues of slaughtered steers: risk assessment for the consumers. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 28787-28795, 2019.
34. AMBUSHE, A. A.; HLONGWANE, M. M.; MCCRINDLE, R. I. & MCCRINDLE, C. M. E. Assessment of Levels of V, Cr, Mn, Sr, Cd, Pb and U in Bovine Meat. *South African Journal of Chemistry*, 65, 159-164, 2012.
35. Krug, F. J. & Rocha, F. R. P. "Métodos de preparo de amostras para análise elementar". São Paulo: EditSBQ, 2016. p. 572.
36. Flores, E. M. M. F. "Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination". Amsterdam: Elsevier, 2014.
37. MALLAPUDI, V. B. K.; CHANDRASEKARAN, K.; VENKATESWARLU, G. & KARUNASAGAR, D. Development of a simple and rapid microwave-assisted extraction method using very dilute solutions of perchloric acid and hydrogen peroxide for the multi-elemental analysis of food materials by ICP-OES: A green analytical method. *Microchemical Journal*, 146, 807-817, 2019.
38. BAKIRCIOGLU, D.; TOPRAKSEVER, N.; YURTSEVER, S.; KIZILDERE, M. & KURTULUS, Y. B. Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey. *Microchemical Journal*, 136, 133-138, 2018.
39. MILLOUR, S.; NOEL, L.; KADAR, A.; CHEKRI, R.; VASTEL, C. & GUÉRIN, T. Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition Analysis*, 24, 111-120, 2011.
40. ANNA, S-M. A simple and rapid method for the multi-element analysis of wheat crisp bread products by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Journal of AOAC International*, 97(6), 1656-1660, 2014.
41. KRISHNA, M. V. B.; CHANDRASEKARAN, K.; VENKATESWARLU, G. & KARUNASAGAR, D. A cost-effective and rapid microwave-assisted acid extraction method for the multi-elemental analysis of sediments by ICP-AES and ICP-MS. *Analytical Methods*, 4, 3290-3299, 2012.
42. ARAUJO, G. C. L.; GONZALES, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. N. A. & NOBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Parte B: Atomic Spectroscopy*, 57, 2121-2132, 2002.
43. SAPKOTA, A.; KRACHLER, M.; SCHOLZ, C.; CHEBURKIN, A. K. & SHOTYK, W. Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, and Ti) and trace (Li, Mn, Sr, and Zn) elements in peat and plant

-
- samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 540, 247-256, 2005.
44. FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. & KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels - A brief overview and recent applications. *Spectrochimica Acta Parte B: Atomic Spectroscopy*, 62, 1051-1064, 2007.
 45. BARIN, J. S.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; KNORR, C. L.; MORAES, D. P.; MESKOC, M. F.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. & FLORES, E. M. M. Focused microwave-induced combustion for digestion of botanical samples and metals determination by ICP OES and ICP-MS. *Talanta*, 94, 308-314, 2012.
 46. MESKO, M. F.; HARTWIG, C. A.; BIZZI, C. A.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307, 123-136, 2011.
 47. BENDICHO, C.; LAVILLA, I.; PENA-PEREIRA, F. & ROMERO, V. Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27, 1831-1857, 2012.
 48. BIZZI, C. A.; FLORES, E. L. M.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDTA, L. & MORTARI, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29, 332-338, 2014.
 49. BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E. M. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A. & KORN, M. G. A. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. *Food Chemistry*, 175, 212-217, 2015.
 50. WURFELS, M. & JACKWERTH, E. Investigations on the carbono balance in decomposition of biological materials with nitric acid. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 322, 345-358, 1985.
 51. KUBRAKOVA, I. V.; FORMANOVSKII, A. A.; KUDINOVA, T. F. & KUZ'MIN, N. M. Microwave oxidation of organic compounds by nitric acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 54, 460-465, 1999.
 52. CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P. C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A. & KORN, M. G. A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, 78, 1378-1382, 2009.
 53. GONZALE, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A. & NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta*, 79, 396-401, 2009.
 54. BRESSY, F. C.; BRITO, G. B.; BARBOSA, I. S.; TEIXEIRA, L. S. G. & KORN, M. G. A. Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion. *Microchemical Journal*, 109, 145-149, 2013.
 55. BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A.; DRESSLER, V. L. & FLORES, E. M. M. Improvement of microwave-assisted digestion of milk

-
- powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 66, 394-398, 2011.
56. BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MELLO, P. A. & FLORES, E. M. M. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. *Analytica Chimica Acta*, 837, 16-22, 2014.
 57. BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MÜLLER, E. I.; SCHMIDT, L.; NÓBREGA, J. A. & FLORES, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. *Talanta*, 83, 1324-1328, 2010.
 58. BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLOTO, R. S.; BARIN, J. S. & NÓBREGA, J.A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. *Analytical Methods*, 2, 734-738, 2010.
 59. BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E. & NÓBREGA, J. A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. *Microchemical Journal*, 99, 193-196, 2011.
 60. CORREIA, F. O.; SILVA, D. S.; COSTA, S. S. L.; SILVA, I. K. V.; DA SILVA, D. R.; ALVES, J. DO P. H.; GARCIA, C. A. B.; MARANHÃO, T. DE A.; PASSOS, E. A. & ARAUJO, R. G. O. Optimization of microwave digestion and inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics. *Microchemical Journal*, 135, 190-198, 2017.
 61. TARANTINO, T. B.; BARBOSA, I. S.; LIMA, D. DE L.; PEREIRA, M. DE G.; TEIXEIRA, L. S. G. & KORN, M. G. A. Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Nitric Acid for Multi-element Determination in Rice by ICP OES and ICP-MS. *Food Analytical Methods*, 10, 1007-1015, 2017.
 62. MULLER, E. I.; SOUZA, J. P.; MULLER, C. C.; MULLER, A. L. H.; MELLO, P. A. & BIZZI, C. A. Microwave-assisted wet digestion with H₂O₂ at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. *Talanta*, 156-157, 232-238, 2016.
 63. KILIC, S. & SOYLAK, M. Determination of trace element contaminants in herbal teas using ICP-MS by different sample preparation method. *Journal of Food Science and Technology*, 57(3), 927-933, 2019.
 64. PARDINHO, R. B.; DALLA VECCHIA, P.; MENDES, A. L. G.; BIZZI, C. A.; MELLO, P. A.; DUARTE, F. A. & FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O₂ pressure. *Food Chemistry*, 263, 37-41, 2018.
 65. SANTOS, H. M.; COUTINHO, J. P.; AMORIM, F. A. C.; LÔBO, I. P.; MOREIRA, L. S.; NASCIMENTO, M. M. & DE JESUS, R. M. Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. *Food Chemistry*, 273, 133-137, 2019.
 66. LO DICO, G. M.; GALVANO, F.; DUGO, G.; D'ASCENZI, C.; MACALUSO, A.; VELLA, A.; GIANGROSSO, G.; CAMMILERI, G. & FERRANTELLI, V. Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, 245, 1163-1168, 2018.

67. MULLER, E. I.; MULLER, C. C.; SOUZA, J. P.; MULLER, A. L. H.; ENDERS, M. S. P.; DONEDA, M.; FROHLICH, A. C.; IOP, G. D. & ANSCHAU, K. F. Green microwave-assisted wet digestion method of carbohydrate-rich foods with hydrogen peroxide using single reaction chamber and further elemental determination using ICP-OES and ICP-MS. *Microchemical Journal*, 134, 257-261, 2017.
68. MOORE, G. L. "Introduction to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry". Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 340.
69. KRUG, F.J.; NOBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A.; OLIVEIRA, P. V. "Guia prático de perguntas e respostas sobre ICP-OES, ICP-MS e preparo de amostras". São Carlos: DQ/UFSCar, 2001. p. 2-63.
70. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. "Fundamentos de química analítica". 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006.
71. BECHLIN, M. A. Avaliação do Bismuto como Padrão Interno Universal Para Determinação de Chumbo por Técnicas Espectrométricas Atômicas e de Massas. Araraquara, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – IQ-UNESP, 2017. Tese de doutorado, 121 p.
72. MACHADO, R. C.; SILVA, A. B. S.; AMARAL, C. D. B.; VIRGILIO, A. & NOGUEIRA, A. R. A. Internal standardization as a strategy to overcome non-spectral interferences in the determination of As, Cd and Pb in mineral fertilizers by synchronous vertical dual view (SVDV) ICP OES. *Analytical Methods*, 12, 39-45, 2020.
73. DRUZIANA, G. T.; GIESBRECHTA, C. K.; ROSA, F. C.; GUIMARÃES, R. C. L.; GUARNIERIB, R. A.; MELLO, P. A. & FLORES, E. M. M. Determinação simultânea de metais e enxofre por ICP-OES em resíduos de destilação de petróleo. *Química Nova*, 39(9), 1065-1070, 2016.
74. VIRGILIO, A.; GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A. & DONATI, G. L. Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 982, 31-36, 2017.
75. CARTER, J. A.; BARROS, A. I.; NÓBREGA, J. A. & DONATI, G. L. Traditional calibration methods in atomic spectrometry and new calibration strategies for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Frontiers in Chemistry*, 6, 2018.
76. SOUZA, S. O; ÁVILA, D. V. L; MONTEIRO, A. S. C.; GARCIA, C. A. B., ALVES, J. P. H.; MARANHÃO, T. A. & ARAUJO, R. G. O. Simultaneous determination of thorium and uranium in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(4), 799-806, 2016.
77. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S. & WILLIAMS, C. B. Recent advances in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(7), 1283-1296, 2017.
78. HOU, X.; AMAIS, R. S.; JONES, B. T. & DONATI, G. L. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Atomic spectroscopy*, 2016.
79. AMARAL, C. D. B.; SCHIAVO, D.; BARROS, J. A. V. A.; MACHADO, R. C.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. Characterization of synchronous vertical dual view inductively coupled plasma optical emission spectrometer with application for water analysis. *Analytical Letters*, 49(13), 2092-2098, 2016.

80. CAUDURO, J. & RYAN, A. Ultra-fast determination of trace elements in water, conforming to US EPA 200.7 using the Agilent 5100 synchronous vertical dual view ICP-OES. Agilent application note:5991-4821EN, 2014.
81. GAMELA, R. R.; COSTA, V. C. & PEREIRA-FILHO, E. R. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn in pepper samples by ICP OES. *Food Analytical Methods*, 13, 69-77, 2019.
82. HIGUERA, J. M.; SILVA, A. B. S. & NOGUEIRA, A. R. A. Multi-energy calibration: A practical method for determination of macro and micro nutrients in meat by ICP OES. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(12), 2575-2581, 2019.
83. DA SILVA, I. J. S.; LAVORANTE, A. F.; PAIM, A. P. S. & DA SILVA, M. J. Microwave-assisted digestion employing diluted nitric acid for mineral determination in rice by ICP OES. *Food Chemistry*, 319, 126435, 2020.
84. AMARAL, C. D. B; MACHADO, R. C.; BARROS, J. A. V. A.; VIRGÍLIO, A.; SCHIAVO, D.; NOGUEIRA, A. R. A. & NOBREGA, J. A. Determination of rare earth elements in geological and agricultural samples by ICP-OES. *Spectroscopy*, 32(10), 32-36, 2017.
85. FATHABAD, A. E.; SHARIATIFAR, N.; MOAZZEN, M.; NAZMARA, S.; FAKHRI, Y.; ALIMOHAMMADI, M.; AZARI, A. & KHANEGHAH, A. M. Determination of heavy metal content of processed fruit products from Tehran's market using ICP- OES: A risk assessment study. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 436-446, 2018.
86. SCHEFFLER, G. L. & POZEBON, D. Trace element determination in leather samples using on-line internal standardization, ultrasonic nebulization and axial view-ICP OES. *Analytical Methods*, 7(12), 5180-5185, 2015.
87. SOUZA, E. J. DOS S.; AMARAL, C. D. B.; NAGATA, N. & GRASSI, M. T. Cloud point extractors for simultaneous determination of Pd and Pt in water samples by ICP OES with multivariate optimisation. *Microchemical Journal*, 152, 104309, 2020.
88. MOHAJER, A.; BAGHANI, A. N.; SADIGHARA, P.; GHANATI, K. & NAZMARA, S. Determination and health risk assessment of heavy metals in imported rice bran oil in iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103384, 2020.
89. BIATA, N. R.; MASHILE, G. P.; RAMONTJA, J.; MKETO, N. & NOMNGONGO, P. N. Application of ultrasound-assisted cloud point extraction for preconcentration of antimony, tin and thallium in food and water samples prior to ICP-OES determination. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 14-21, 2019.
90. BAIKA, L. M.; SANTOS, E. J. D.; HERRMANN, A. B. & GRASSI, M. T. Simultaneous determination of As, Hg, Sb, and Se in mineral fertilizers using ultrasonic extraction and CVG-ICP OES. *Analytical Methods*, 8(47), 8362-8367, 2016.
91. POIRIER, L.; NELSON, J.; LEONG, D.; BERHANE, L.; HAJDU, P. & LOPEZ-LINARES, F. Application of ICP-MS and ICP-OES on the determination of nickel, vanadium, iron, and calcium in petroleum crude oils via direct dilution. *Energy & Fuels*, 30(5), 3783-3790, 2016.
92. NYABA, L. & NOMNGONGO, P. N. Determination of trace metals in vegetables and water samples using dispersive ultrasound-assisted cloud

-
- point- dispersive μ -solid phase extraction coupled with inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Chemistry*, 126749, 2020.
93. DIVIŠ, P.; ŠTÁVOVÁ, E.; POŘÍZKA, J. & DRÁBIKOVÁ, J. Determination of tin, chromium, cadmium and lead in canned fruits from the czech market. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 11(1), 564-570, 2017.
 94. WILSCHEFSKI, S. C. & BAXTER, M. R. Inductively coupled plasma mass spectrometry: introduction to analytical aspects. *The Clinical Biochemist Reviews*, 40, 115-133, 2019.
 95. THOMAS, R. J. "Practical Guide to ICP-MS". 3a ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. p. 73-90.
 96. BALCAEN, L.; BOLEA-FERNANDEZ, E.; RESANO, M. & VANHAECKE, F. Inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, 894, 7-19, 2015.
 97. AMAIS, R. S.; VIRGILIO, A.; SCHIAVO, D. & NÓBREGA, J. A. Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS) for overcoming molybdenum oxide interferences on Cd determination in milk. *Microchemical Journal*, 120, 64-68, 2015.
 98. KARANDASHEV, V. K.; LEIKIN, A. Y.; KHVOSTIKOV, V. A.; KUTSEVA, N. K. & PIROGOVA, S. V. Water analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Inorganic Materials*, 52(14), 1391-1404, 2016.
 99. D'ILIO, S.; VIOLANTE, N.; MAJORANI, C. & PETRUCCI, F. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a change? a review. *Analytica Chimica Acta*, 698, 6-13, 2011.
 100. LUM, T.-S.; LEUNG, K. S.-Y. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(5), 1078-1088, 2016.
 101. SUGIYAMA, N. & NAKANO, K. Reaction data for 70 elements using O₂, NH₃ and H₂ gases with the Agilent 8800 triple quadrupole ICP-MS. Technical note. *Agilent Technologies*, 1-14, 2014.
 102. JACKSON, B. P.; LIBAB, A. & NELSON, J. Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30 (5): 1179-1183, 2015.
 103. CHRISTOPHER, S. J. & THOMPSON, R. Q. Determination of trace level cadmium in SRM 3280 multivitamin/multielement tablets via isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 116, 18-25, 2013.
 104. VIRGILIO, A.; AMAIS, R. S.; AMARAL, C. D. B.; FIALHO, L. L.; SCHIAVO, D. & NÓBREGA, J. A. Reactivity and analytical performance of oxygen as cell gas in inductively coupled plasma tandem mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 126, 31-36, 2016.
 105. FERNANDEZ, E. B.; BALCAEN, L.; RESANO, M. & VANHAECKE, F. Overcoming spectral overlap via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32, 1660-1679, 2017.
 106. POTORTÌ, A. G.; BUA, D. G.; TURCO, V. L.; TEKAYA, A. B.; BELTIFA, A.; MANSOUR, H. B.; DUGO, G. & BELLA, G. D. Major, minor and trace element concentrations in spices and aromatic herbs from Sicily (Italy) and Mahdia (Tunisia) by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chemistry*, 126094, 2019

107. FILIPIAK-SZOK, A.; KURZAWA, M. & SZŁYK, E. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 54-58, 2015.
108. AHMED, M.; CHIN, Y. H.; GUO, X.; ZHAO, X.-M. Microwave assisted digestion followed by ICP-MS for determination of trace metals in atmospheric and lake ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 55, 1-10, 2017.
109. LEMOINE, L.; THIJSSSEN, E.; NOBEN, J.-P.; ADRIAENSENS, P.; CARLEER, R. & SPEETEN, K. V. der. A validated inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the quantification of total platinum content in plasma, plasma ultrafiltrate, urine and peritoneal fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152, 39-46, 2018.
110. DAY, P. L.; ECKDAHL, S. J.; MALESZEWSKI, J. J.; WRIGHT, T. C. & MURRAY, D. L. Establishing human heart chromium, cobalt and vanadium concentrations by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 41, 60-65, 2017.
111. TOKALIOĞLU, Ş.; DOKAN, F. K. & KÖPRÜ, S. ICP-MS multi-element analysis for determining the origin by multivariate analysis of red pepper flakes from three different regions of Turkey. *LWT- Food Science and Technology*, 103, 301-307, 2019.
112. LIU, Z.; XUE, A.; CHEN, H. & LI, S. Quantitative determination of trace metals in single yeast cells by time-resolved ICP-MS using dissolved standards for calibration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1475-1483, 2019.
113. ANDRADE, A. L. DE; GALAZZI, R. M.; MIRÓ, M. & ARRUDA, M. A. Z. In vitro bioaccessibility of metals from tape tea – A low-cost emerging drug. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126613, 2020.
114. VICENTINO, P. O.; CASSELLAA, R. J.; LEITEB, D. & RESANO, M. Extraction induced by microemulsion breaking as a novel tool for the simultaneous determination of Cd, Mn, Pb and Sb in gasoline samples by ICP-MS and discrete sample introduction
115. MOHAMED, R.; ZAINUDIN, B. H. & YAAKOB, A. S. Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 303, 125392, 2020.
116. ALBENDEAB, P.; SIERRAA, I.; HERNÁNDEZC, C.; BARRADOC, A. I. & YLLERAC, A. Natural uranium isotopes determination in 24h-urine samples from exposed workers to enriched uranium. *Radiation Physics and Chemistry*, 174, 108929, 2020.
117. FISHER, R. A. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of human genetics*, 7, 179-188, 1936.
118. SETSER, A. L. & SMITH, R. W. Comparison of variable selection methods prior to linear discriminant analysis classification of synthetic phenethylamines and tryptamines. *Forensic Chemistry*, 11, 77-86, 2018.
119. LI, C.-N.; SHAO, Y.-H.; WANG, Z. & DENG, N.-Y. Robust bilateral Lp-norm two-dimensional linear discriminant analysis. *Information Sciences*, 500, 274-297, 2019.
120. HANNON, J. S.; HUFF, W. D. & STURMER, D. M. Geochemical relationships in Cretaceous bentonites as inferred from linear discriminant analysis. *Sedimentary Geology*, 390, 1-14, 2019.

121. SANTANA, A. C. DE; SANTANA, A. L. DE; SANTANA, A. L. DE; SANTOS, M. A. S. DOS & OLIVEIRA, C. M. DE. Análise discriminante múltipla do mercado varejista de açaí em Belém do Pará. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(3), 532-541, 2014.
122. FERREIRA, T. R. M. Construção de um modelo utilizando a análise discriminante para a detecção de acidemia fetal. Porto, Universidade do Porto, 2018. Dissertação de mestrado, 75 p.
123. BONETTI, J. Mass spectral differentiation of positional isomers using multivariate statistics. *Forensic Chemistry*, 9, 50-61, 2018.
124. MILLS, M.; BONETTI, J.; BRETTELL, T. & QUARINO, L. Differentiation of human hair by colour and diameter using light microscopy, digital imaging and statistical analysis. *Journal of Microscopy*, 00, 1-14, 2017.
125. NASEER, K.; AMIN, A.; SALEEM, M. & QAZI, J. Raman spectroscopy based differentiation of typhoid and dengue fever in infected human sera. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 206, 197-201, 2019.
126. SHIN, E.-C.; CRAFT, B. D.; PEGG, R. B.; PHILLIPS, R. D. & EITENMILLER, R. R. Chemometric approach to fatty acid profiles in runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). *Food Chemistry*, 119, 1262-1270, 2010.
127. HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M. & JUNIOR, G. J. O. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. *Engineering and Science*, 5(1), 2016.
128. ZHOU, W.; LIU, H.; XU, Q.; LI, P.; ZHAO, L. & GAO, H. Glycerol's generalized two-dimensional correlation IR/NIR spectroscopy and its principal component analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 228, 2020.
129. DOS SANTOS, I. F.; DOS SANTOS, A. M. P.; BARBOSA, U. A.; LIMA, J. S.; DOS SANTOS, D. C. & MATOS, G. D. Multivariate analysis of the mineral content of raw and cooked okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Microchemical Journal*, 110, 439-443, 2013.
130. SOUSA, J. S. Desenvolvimento de Modelos de Calibração Multivariada em Espectroscopia de Infravermelho Próximo para Ácidos Graxos em Amostras de Carne Bovina. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2016. Dissertação de mestrado, 134 p.
131. MUEHLETHALER, C.; MASSONNET, G. & ESSEIVA, P. The application of chemometrics on Infrared and raman spectra as a tool for the forensic analysis of paints. *Forensic Science International*, 209, 173-182, 2011.
132. OVENDEN, S. P. B.; WEBSTER, R. L.; MICICH, E.; MCDOWALL, L. J.; MCGILL, N. W.; WILLIAMS, J. & ZANNATTA, S. D. The identification of chemical attribution signatures of stored VX nerve agents using NMR, GC-MS, and LC-HRMS. *Talanta*, 211, 2020.
133. QUINN, M.; BRETTELL, T.; JOSHI, M.; BONETTI, J. & QUARINO, L. Identifying PCP and four PCP analogs using the gold chloride microcrystalline test followed by raman microspectroscopy and chemometrics. *Forensic Science International*, 307, 110135, 2020.
134. CORREIA, F. O.; SILVA, D. S.; COSTA, S. S. L.; SILVA, I. K. V.; DA SILVA, D. R.; ALVES, J. DO P. H.; GARCIA, C. A. B.; MARANHÃO, T. DE A.; PASSOS, E. A. & ARAUJO, R. G. O. Optimization of microwave digestion and

-
- inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics. *Microchemical Journal*, 135, 190-198, 2017.
135. SCHNEIDER, M.; SCHNEIDER, R. C. S.; CORBELLINI, V. A.; MAHLMANN, C. M.; FIOR, C. S. & FERRÃO, M. F. Exploratory analysis applied for the evaluation of yerba mate adulteration (*Ilex paraguariensis*). *Food Analytical Methods*, 11, 2035-2041, 2018.
 136. COSTA, V. C.; BABOS, D. V.; GAMELA, R. R.; AMORIM, F. A. C. & PEREIRA-FILHO, E. R. Proposition of sample preparation procedure of cassava flour with diluted acid using mixture design and evaluation of nutrient profiles by multivariate data analysis. *Food Analytical Methods*, 2019.
 137. FRAIGE, K.; PEREIRA-FILHO, E. R. & CARRILHO, E. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Food Chemistry*, 145, 395-403, 2014.
 138. LIU, J.; REN, J.; LIU, Z.-M.; GUO, B.-H. A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food Chemistry*, 172, 251-256, 2015.
 139. BRITO, A. L. B.; OLIVEIRA, A. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; PESSOA, A. G. G.; PONTES, L. F. B. L. Determination of inorganic constituents and physicochemical characterization of functional flour samples. *Microchemical Journal*, 132, 112-118, 2017.
 140. BREIMAN, L. *Machine learning*. Springer, 45(1), 5-32, 2001.
 141. BREIMAN, L. & CUTLER, A. "An introduction to random forest for beginners". 1ed. Califórnia: Salford Systems, 2014. p. 71.
 142. IBÁÑEZ, M. M. *Uso de Redes Neurais Nebulosas e Florestas Aleatórias na Classificação de Imagens em um Projeto de Ciência Cidadã*. São José dos Campos, Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais - INPE 2016. Dissertação de mestrado, 123 p.
 143. SILVA, J. C. da. *Aprendendo em uma Floresta Aleatória*. *Machina Sapiens*, 2018. Disponível em: <https://medium.com/machina-sapiens/o-algoritmo-da-floresta-aleat%C3%B3ria-3545f6babdf8>. Acesso em: 16 de junho 2020.
 144. DMITRIEVSKY, M. *Floresta de decisão aleatória na aprendizagem por esforço*. *MQL5*, 2018. Disponível em: <https://www.mql5.com/pt/articles/3856>. Acesso em 16 de junho 2020.
 145. BASAK, S.; KAR, S.; SAHA, S.; KHAIDEM, L. & DEY, R. S.; Predicting the direction of stock market prices using tree-based classifiers. *North American Journal of Economics and Finance*, 47, 552-567, 2018.
 146. LOVATTI, B. P. O. *Métodos de Aprendizagem de Máquina em Química Analítica: Floresta Randômica Aplicada na Avaliação de Petróleo*. Vitória, Programa de Pós-Graduação em Química – UFES, 2019. Tese de doutorado, 141 p.
 147. AKBARI, S. & MARDUKHI, F. Classification of bank customers using the random forest algorithm. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science*, 29, 828-832, 2014.
 148. RUSTAM, Z. & SARAGIH, G. S. "Predicting bank financial failures using random forest". In: *International Workshop on Big Data and Information Security (IWBS)*. Jakarta – IDN, 2018. vol. 1, p. 81-86.

149. LIN, W.; WU, Z.; LIN, L.; WEN, A. & LI, J. An ensemble random forest algorithm for insurance big data analysis. *IEEE Access*, 5, 16568-16575, 2017.
150. ELAGAMY, M. N.; STANIER, C. & SHARP, B. "Stock market random forest-text mining system mining critical indicators of stock market movements". In: II International Conference on Natural Language and Speech Processing (ICNLSP). Algiers – Algeria, 2018.
151. HUSAIN, W.; XIN, L. K.; RASHID, N. A. & JOTHI, N. "Predicting generalized anxiety disorder among women using random forest approach". In: III International Conference on Computer and Information Sciences (ICCOINS). Kuala Lumpur – Malaysia, 2018. vol. 3, p. 37-42.
152. DUBRAVA, S.; MARDEKIAN, J.; SADOSKY, A.; BIENEN, E. J.; PARSONS, B.; HOPPS, M. & MARKMAN, J. Using Random Forest Models to Identify Correlates of a Diabetic Peripheral Neuropathy Diagnosis from Electronic Health Record Data. *Pain Medicine*, 18(1), 107-115, 2016.
153. Pesquisa base de dados. Web of Science. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez31.periodicos.capes.gov.br/>. Acesso em 3 de julho de 2020.
154. MAIONE, C.; LEMOS, B. B.; CAMPIGLIA, A. D.; BARBOSA, J. F. & BARBOSA, R. M. Classification of geographic origino of rice by data mining and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Computera and Electronics in Agriculture*, 121, 101-107, 2016.
155. AI, F.; BIN, J.; ZHANG, Z.; HUANG, J.; WANG, J.; LIANG, Y.; YU, L. & YANG, Z. Application of random forests to select premium quality vegetable oils by their fatty acid composition. *Food Chemistry*, 143, 472-478, 2014.
156. CANIZO, B. V.; ESCUDERO, L. B.; PÉREZ, M. B. & PELLERANO, R. G. Intraregional classification of grape seeds produced in Mendoza province (Argentina) by multi-elemental analysis and chemometrics tools. *Food Chemistry*, 242, 272-278, 2018.
157. FATHI, F.; MAJARI-KASMAEE, L.; MANI-VARNOSFADERANI, A.; KYANI, A.; ROSTAMI-NEJAD, M.; SOHRABZADEH, K.; NADERI, N.; ZALI, M. R.; REZAEI-TAVIRANI, M.; TAFAZOLLI, M. & AREFI-OSKOUIE, A. 1H NMR based metabolic profiling in Crohn's disease by random forest methodology. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 52(7), 370-376, 2014.
158. GHAEDI, M.; GHAEDI, A. M.; NEGINTAJI, E.; ANSARI, A.; VAFAEI, A. & RAJABI, M. Random forest model for removal of bromophenol blue using activated carbon obtained from *Astragalus bisulcatus* tree. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 1793-1803, 2014.
159. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, agosto de 2016.
160. IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. (2017). Compendium of chemical terminology. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/pdf/goldbook.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2020.
161. VIEIRA, A. L.; MIRANDA, K.; VIRGILIO, A.; FERREIRA, E. C. & GOMES NETO, J. A. Evaluation of an improved closed-vessel conductively heated digestion system for the analysis of raw meat samples by ICP techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33(8), 1354-1362, 2018.