

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO COM
EMPREGO DA ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA PARA A DETERMINAÇÃO DE Cd, Fe, Pb E Zn
EM AMOSTRAS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO**

JOSÉ AUGUSTO DA COL*

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

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

* bolsista CNPq

**São Carlos - SP
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C683dm

Col, José Augusto da.

Desenvolvimento de método analítico com emprego da espectrometria de absorção atômica para a determinação de Cd, Fe, Pb e Zn em amostras de interesse alimentício / José Augusto da Col. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
76 f.

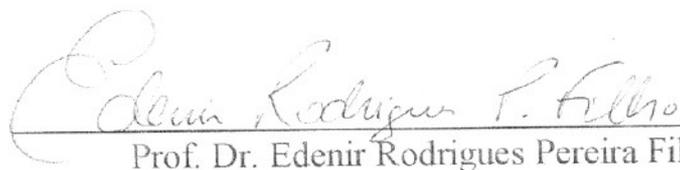
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

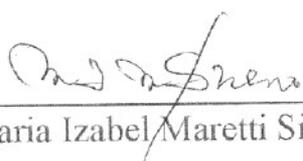
1. Química analítica. 2. Espectroscopia de absorção atômica. 3. TS-FF-AAS. 4. Alimentos - análise. I. Título.

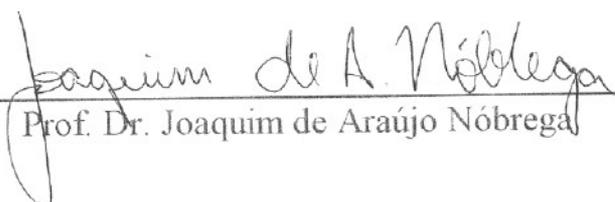
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado do candidato José Augusto da Col realizado em 31 de julho de 2008:


Prof. Dr. Edénir Rodrigues Pereira Filho


Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno


Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

*Eu canto samba
Por que só assim eu me sinto contente
Eu vou ao samba
Porque longe dele eu não posso viver
Com ele eu tenho de fato uma velha intimidade
Se fico sozinho ele vem me socorrer
Há muito tempo eu escuto esse papo furado
Dizendo que o samba acabou
Só se foi quando o dia clareou*

*O samba é alegria
Falando coisas da gente
Se você anda tristonho
No samba fica contente
Segure o choro criança
Vou te fazer um carinho
Levando um samba de leve
Nas cordas do meu cavaquinho*

(Paulinho da Viola)

Agradeço e dedico esta dissertação aos meus amados pais, Sebastião e Wanda, por terem me apoiado sempre e, principalmente, por terem acreditado em mim quando nem eu mais acreditava. Dedico também ao meu irmão José Alexandre, pela amizade e alegria de sempre.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, pela amizade, generosidade e por ter possibilitado a oportunidade de aprender uma visão moderna da Química Analítica.

À Profa. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira e ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, pelos belos ensinamentos e exemplos proporcionados durante a convivência no Grupo de Análise Instrumental Aplicada (Gaia).

À Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno, minha orientadora de iniciação científica, com quem aprendi o grande valor da ética na pesquisa científica.

À Profa. Dra. Semíramis M. A. Domene, pelas informações e amostras de alimentos cedidas para a execução desse trabalho.

Aos amigos André F. P. Biajoli e Rodrigo F. P. Junqueira, pela ajuda e sugestões nos textos escritos em língua inglesa.

À toda a minha família, principalmente às tias Valéria, Wanilda e Wonía, que por muitas vezes foram minhas segundas mães, à minha prima Valerinha, a irmã que não tive, à minha cunhada Maria Carolina e minha linda sobrinha Manuela.

Aos queridos Elisabete e José Roberto Biajoli, que sempre me trataram com tamanho carinho e que são minha família adotiva em Campinas.

Aos amigos de longa data de Socorro, que me enchem de orgulho e felicidade: Ana Carla e Marcelo, Bianca, Elcilaine, Flávia e Ernani, Jeferson Tavares, Magele, Rosana e Eckner.

Aos amigos de fé de Campinas: Adriano (Borges), Adriano Francino (Gordinho 99), Aluizio Virgulino, André Francisco (Gago), André Zuin, Bárbara Carlos (Barbs), Carla Porto e Eduardo Pilau, Ernesto, Fábio Hossri, Fabíola, Fernando Pessoa, Fernando Sodré, Flávio Ghilardi, Gedeon, Gisele, Guilherme (Rato), Jana (99), José Mateus (Pepeca), Juliana Paschoal, Juliano (98), Julio César, Karen, Leandro (Presunto), Leandro Martinez, Leonardo (Chang), Lincoln, Luís Gustavo (LG), Márcio (Gauchinho), Marco (99), Maria Clara Biajoli, Mulherada 01, Priscila (99), Renato (Pinhal), Rogério Non , Sebastiao e família (Livraria da Química), Sérgio Camargo Júnior, S lvio Sawaia e irmãos, Thaís, Thiago (Gandhi), Tiago (Itapira) e a todos os colegas do IQ-Unicamp, principalmente os da Turma 02.

Aos amigos da República Narguilé (São Carlos): Carol, Vivi (Fisio 04), Andrey, Bruno (Mazzotti), Eduardo (Mion), Felipe (Gizmo), Gláucio (Dalai), Heitor (Neo), Renato (Varalda) e Rodrigo (Campinero), pela amizade e, principalmente, pelo companheirismo nas longas jornadas das quartas-feiras.

A todos os colegas do Gaia: Adriana Alice, Adriana Nori, Allen, Amália, Andréa, Ana Beatriz, Caio, Carla, Carolina, Catarinie, Eveline, Fernanda, Gilberto, Juliana, Kelber, Larissa, Mário, Marcelo, Marquinho, Natália, Patrícia, Paula, Rodolfo, Silmara, Silvéria, Sílvia, Simone, Thiago, Wladiana e aos ex-Gaia: Alexandra, Andréa, Cláudia, Edivan, Lillian, Sherlan e Telma.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria e seus alunos, pela gentil acolhida durante a reforma do nosso laboratório.

Aos amigos do Departamento de Química da UFSCar: Alberth (Salgadinho), Bruno, Fábio (March), Fernando (24), Geiser, Lúcio, Luiz (Zizinho), Osmundo, Otávio, Pasta, Ricardo (Jovem) e Rickas.

Aos colegas do Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM): Fernando, Juninho e Rose, pela grande ajuda durante o desenvolvimento da parte experimental desse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar, aos funcionários do DQ e principalmente às secretárias da Pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani, pela presteza e gentileza com que sempre me trataram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar pela oportunidade.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo concedida.

Muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APDC	Pirrolidinoditiocarbamato de amônio
CFA-C	Aminas terciárias solúveis em água
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
D-CPE	Extração por ponto nuvem com deslocamento de íons (do inglês <i>Displacement-Cloud Point Extraction</i>)
DDAB	Brometo de di-dodecildimetilamônio
DDTC	Dietilditiocarbamato de sódio
DDTP	O, O-dietilditiofosfato
DHB	Ácido dihidroxibenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês <i>Electrothermal AAS</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês <i>Flame AAS</i>)
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês <i>Graphite Furnace AAS</i>)
HG-AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (do inglês <i>Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)

ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (do inglês <i>Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i>)
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês <i>Multiwall Carbon Nanotubes</i>)
NEPA	Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PCA	Análise de componentes principais (do inglês <i>Principal Component Analysis</i>)
PLS	Método dos mínimos quadrados parciais (do inglês <i>Partial Least Squares</i>)
PTFE	Politetrafluoretileno
PUF	Espuma de poliuretano (do inglês <i>polyurethane foam</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TAM	2-(2-tiazolilazo)-5-dimetilaminofenol
TS-FF-AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (do inglês <i>Thermospray Flame Furnace AAS</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
XRF	Fluorescência de raios-X (do inglês <i>X-ray Fluorescence</i>)

Lista de Tabelas

TABELA 4.1.1. Condições experimentais para as medidas espectrométricas em absorção atômica para a determinação de Cd, Fe, Pb e Zn.....	33
TABELA 4.1.1.1. Composição das ligas de Hastelloy 276c e Níquel 200	35
TABELA 4.1.1.2. Propriedades físicas das ligas de Hastelloy 276c e Níquel 200.....	35
TABELA 4.5.1.1. Experimentos realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a otimização das condições do sistema operacional da TS-FF-AAS	38
TABELA 4.5.2.1. Experimentos realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} para a otimização das condições de extração dos metais nas amostras de alimentos	39
TABELA 4.5.4.1. Programa de digestão assistida por radiação microondas empregado para a decomposição das amostras de alimentos	41
TABELA 5.1.2.1. Parâmetros analíticos obtidos nos experimentos univariados para os volumes de amostra de 50, 100, 200 e 300 μ L	47
TABELA 5.1.2.2. Respostas analíticas obtidas nos experimentos univariados para as concentrações de HNO_3 de 0,00175; 0,00350; 0,00700 e 0,0140 mol/L	49
TABELA 5.1.5.1. Condições ótimas para a operação do sistema de TS-FF-AAS.....	51
TABELA 5.2.1. Condições otimizadas para a extração de Zn na amostra FG.....	54
TABELA 5.4.3.1. Valores de concentração (mg/kg) para Zn nas amostras de merenda escolar.....	61
TABELA 5.4.4.1. Valores de concentração (mg/kg) para Fe nas amostras de merenda escolar.....	63

Lista de Figuras

FIGURA 4.1.1.1. Esquema representativo da montagem do sistema da TS-FF-AAS	34
FIGURA 5.1.1. (Parte 1) Sinais analíticos dos padrões de Zn introduzidos em triplicata (25, 50, 75, 100 e 125 µg/L) obtidos no planejamento experimental para os experimentos 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e) e 6 (f)	44
FIGURA 5.1.1. (Parte 2) Sinais analíticos dos padrões de Zn introduzidos em triplicata (25, 50, 75, 100 e 125 µg/L) obtidos no planejamento experimental para os experimentos 7 (g) e 8 (h)	45
FIGURA 5.1.1.1. Gráfico de probabilidades para a resposta inclinação da reta (a) ..	46
FIGURA 5.1.3.1. Gráfico de probabilidades para a resposta limite de detecção (LD)	48
FIGURA 5.1.5.1. Gráfico de probabilidades para a resposta desvio padrão relativo dos brancos (RSD).....	50
FIGURA 5.2.1. Gráfico de probabilidades para as concentrações normalizadas de Zn no suplemento alimentar.	52
FIGURA 5.3.1. Influência do tamanho das partículas na capacidade de extração de Fe e Zn para a amostra AL.....	55
FIGURA 5.4.1.1. Exemplo de sinais transientes para soluções de padrão de Pb (100, 200, 300, 400 e 500 µg/L), brancos, suplemento alimentar (FG) e CRM introduzidos em triplicata no sistema TS-FF-AAS	57
FIGURA 5.4.2.1. Exemplo de sinais transientes para soluções de padrão de Cd (5,0, 10, 15, 20 e 25 µg/L), brancos, suplemento alimentar (FG) e CRM introduzidos em triplicata no sistema TS-FF-AAS	58

RESUMO

A Química Analítica desempenha um papel fundamental na proposição de procedimentos rápidos e confiáveis para a análise de alimentos. A adequada seleção e introdução de alimentos complementares reduz as deficiências de micronutrientes. Este estudo teve como objetivo a proposição de um método para se verificar o uso de suplementos alimentares adequados com relação às concentrações dos elementos Cd, Fe, Pb e Zn. No desenvolvimento deste método foi utilizado o planejamento fatorial como ferramenta para sua otimização das condições experimentais. Os metais foram determinados por espectrometria de absorção atômica com chama - FAAS (Fe e Zn) e por espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico - TS-FF-AAS (Cd e Pb). Em TS-FF-AAS, um tubo de níquel é utilizado como atomizador e, dessa forma, um aumento na sensibilidade do método é conseguido, uma vez que toda a amostra é inserida no interior do tubo. Além disso, o tempo de residência na chama é prolongado, aumentando a eficiência dos processos de atomização. Aliado a isso, um procedimento simples no qual a amostra (100 mg) é misturada com HCl 0,1 mol/L foi proposto. Das análises dos alimentos, foram obtidos limites de detecção (LD) de 0,6; 100; 6,0 e 32 $\mu\text{g/L}$ para Cd, Fe, Pb e Zn, respectivamente. Os desvios padrão relativos (RSD) para os elementos Cd ($n = 14$), Fe ($n = 3$) e Zn ($n = 19$) foram de 7,0; 5,5 e 6,0%, respectivamente. A frequência analítica do método foi de 28 determinações por hora e a frequência de amostragem, de 8 amostras por hora (desde o preparo de amostra até a determinação). Todas as determinações foram desenvolvidas com o uso de um mesmo tubo atomizador que, após 2270 determinações (cerca de 76 horas), não apresentou perdas de sensibilidade. Dessa forma, para o material certificado de referência de fígado bovino (SRM 1577b), os resultados para Cd e Zn foram adequados e as concentrações de Fe determinadas foram altamente dependentes do tamanho de partículas. Os metais tóxicos Cd e Pb não foram encontrados nas amostras estudadas de alimentos. Com relação aos elementos essenciais, não houve acréscimo de Fe e Zn ao alimento quando do uso do suplemento. Dessa forma, informações acerca da qualidade dos alimentos puderam ser obtidas, sendo o método proposto adequado para essa finalidade.

ABSTRACT

Analytical chemistry plays a fundamental role in proposing fast and reliable procedures to analyze food samples. Proper selection and introduction of complementary foods reduces the vulnerability to micronutrient deficiencies. This study aimed to propose a sensitive approach for the promotion of adequate food supplements regarding Cd, Fe, Pb and Zn contents. For the development of this method, factorial design was used for experimental conditions optimization. These metals were determined using Flame Atomic Absorption Spectrometry - FAAS (Fe and Zn) and Thermospray Flame Furnace AAS (Cd and Pb). In TS-FF-AAS, a nickel tube is used as atomizer; since the sample is totally introduced into the tube, an increase in method sensitivity is obtained. Besides, flame residence time is extended, increasing efficiency of atomizing processes. Additionally, a simple procedure mixing the sample (100 mg) with 0.1 mol/L HCl was proposed. In food analysis, limits of detection (LOD) of 0.6, 100, 6.0 and 32 $\mu\text{g/L}$ for Cd, Fe, Pb and Zn were obtained, respectively. Standard Relative Deviations (RSD) for elements Cd ($n = 14$), Fe ($n = 3$) and Zn ($n = 19$) were of 7.0, 5.5 and 6.0%, respectively. Analytical frequency of the method was of 28 determinations per hour with an analytical speed of 8 samples per hour (from sample preparation to determination). All determinations were performed with the same atomizing tube, which, even after 2270 determinations (around 76 h), did not present sensitivity losses. Cadmium and Zn showed suitable results when a bovine liver certified sample (SRM 1577b) was studied and the Fe content was strongly correlated to the size of the particle. Toxic metals Cd and Pb were not detected in the studied food samples. Regarding the essential elements, there was no increase in the Fe and Zn when the supplement is used. Information about food quality could be obtained, and the proposed method fits the purpose.

SUMÁRIO

1 – Introdução	2
2 – Objetivos	5
3 – Revisão Bibliográfica	7
3.1 - Espectrometria de absorção atômica (AAS)	7
3.2 - Elementos de interesse investigados nesse trabalho	8
3.2.1 - Elementos essenciais: Ferro e Zinco	8
3.2.2 - Elementos tóxicos: Cádmio e Chumbo	9
3.3 - Técnicas de preparo de amostras para alimentos	10
3.4 - Métodos de decomposição das amostras por via seca e úmida	11
3.5 - Extração (lixiviação) dos metais das amostras	17
3.6 - Análise de merenda escolar.....	21
3.7 - Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS).....	22
3.8 - Uso da técnica de espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS).....	25
4 - Parte Experimental	33
4.1 - Equipamentos e acessórios	33
4.1.1 - Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS)	34
4.2 - Reagentes e soluções.....	36
4.3 - Amostras e materiais de referência certificados.....	36
4.4 - Descontaminação dos materiais	37
4.5 - Procedimento Experimental	37
4.5.1 - Otimização do sistema operacional da TS-FF-AAS	37
4.5.2 - Otimização das condições de extração dos metais nas amostras de alimentos	38
4.5.3 - Avaliação da extração dos metais em função do tamanho de partícula...40	
4.5.4 - Digestão das amostras por radiação microondas	40

5 – Resultados e Discussão	43
5.1 - Otimização das condições operacionais da TS-FF-AAS.....	43
5.1.1 - Avaliação da resposta inclinação da reta (a) para o planejamento experimental.....	45
5.1.2 - Avaliação de forma univariada do efeito do volume de amostra na sensibilidade e frequência analítica.....	47
5.1.3 - Avaliação da resposta limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o planejamento experimental	48
5.1.4 - Avaliação de forma univariada da concentração de HNO ₃ como carregador na sensibilidade do método	49
5.1.5 - Avaliação da resposta desvio padrão relativo (RSD) para o planejamento experimental.....	50
5.2 - Otimização das condições de extração dos metais com ácido diluído.....	51
5.3 - Avaliação da extração de metais com relação ao tamanho das partículas das amostras.....	54
5.4 - Quantificação dos metais nas amostras de merenda escolar	56
5.4.1 - Determinação de Pb nas amostras de alimentos.....	56
5.4.2 - Determinação de Cd nas amostras de alimentos.....	58
5.4.3 - Determinação de Zn nas amostras de alimentos	60
5.4.4 - Determinação de Fe nas amostras de alimentos	62
6 – Conclusões	66
7 – Referências Bibliográficas	69

Capítulo 1:

INTRODUÇÃO

1 – Introdução

A fome é um dos graves problemas que afligem a humanidade, sobretudo nos países em desenvolvimento. Estima-se que em todo mundo cerca de 33% das crianças com menos de 5 anos sofrem de complicações relacionadas à má alimentação. No Brasil, cerca de 32 milhões de pessoas são afetadas por esse problema^{1,2}. Como consequência da má alimentação, temos a desnutrição energético-protéica, também conhecida como “fome oculta”, que é a deficiência de micronutrientes, como ferro e zinco, vitaminas e iodo. A desnutrição energético-protéica pode causar várias implicações, como risco de morbimortalidade, atraso mental e motor, sendo que os indivíduos jovens são mais prejudicados por esse estado nutricional inadequado³.

Como forma de minimizar os efeitos da fome, várias iniciativas têm sido empregadas no sentido de fornecer nutrientes à população, principalmente para crianças e adolescentes. Existem três formas básicas de oferecer os nutrientes, como a biofortificação, a suplementação medicamentosa e a fortificação dos alimentos. No caso da biofortificação, variedades de cereais modificados através da bioengenharia são desenvolvidos com teores maiores de micronutrientes, como é o caso de variedades de arroz ricos em ferro ou caroteno. A segunda forma é a suplementação farmacêutica e medicamentosa, que consiste na administração individual de doses farmacológicas de micronutrientes. Esse tratamento é oferecido por um período específico para o combate a uma determinada deficiência, como a suplementação para uma mãe durante a gestação. Nesses casos, são ministrados medicamentos à base de ferro elementar, sulfato de ferro ou óxido de zinco, por exemplo³.

No Brasil, as maiores iniciativas estão no sentido da fortificação dos alimentos, como a incorporação de ferro em farinha de trigo e milho, na proporção mínima de 4,2 mg / 100 g de farinha, e de ácido fólico (vitamina B9), na proporção de 150 µg / 100 g. Esse tipo de fortificação é obrigatória desde o ano de 2002 e é regulada pela resolução RDC 344 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁴. Além da incorporação de ferro nesse tipo de produto, são citados casos de adição em pão doce⁵, açúcar⁶ e leite⁷. Também tem sido muito difundido o uso da multimistura, composta de farelos de trigo e arroz, farinha de trigo, fubá de milho, pó

de casca de ovo, sementes e folhas verde-escuras, como a mandioca. A intenção com o uso desse produto é a de fornecer minerais, vitaminas e fibras⁸⁻¹⁰.

Uma iniciativa que tem como objetivo a suplementação de alimentos destinados a crianças em idade escolar foi desenvolvida pelo Laboratório de Dietética da Faculdade de Nutrição da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas) e utiliza um caldo preparado com fígado de aves. A adição desse suplemento à merenda escolar tem como finalidade a disponibilização de vitaminas, como a C, e nutrientes minerais como ferro e zinco.

Apesar dos esforços de se fornecer elementos essenciais, uma investigação rigorosa deve ser conduzida para se garantir que elementos tóxicos, como Cd e Pb, não estejam presentes nos suplementos. Dependendo das condições de poluição ambiental do local onde os alimentos são produzidos, a incorporação de elementos tóxicos como arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio pode ocorrer em carnes de bovinos, carneiros e aves, por exemplo¹¹.

Dadas essas implicações, há uma grande necessidade de se empregar métodos analíticos no estudo das condições de alimentos e suplementos alimentares. Um exemplo de técnica analítica adequada para as investigações das concentrações de micronutrientes e contaminantes é a espectrometria de absorção atômica, pela sua versatilidade e relativa simplicidade¹². Desse modo, informações acerca do caráter nutricional ou de eventuais contaminações poderão ser obtidas, trazendo maior segurança no consumo dos alimentos.

Capítulo 2:

OBJETIVOS

2 – Objetivos

O objetivo do trabalho realizado foi o estudo das condições de extração e determinação de Cd, Fe, Pb e Zn em alimentos e suplementos alimentares por espectrometria de absorção atômica (AAS). A escolha de um procedimento de preparo das amostras de alimentos que proporcionasse a disponibilização dos analitos de forma prática, rápida e com baixo risco de contaminação também foi buscada, sendo a extração com ácidos diluídos empregada para esse fim. Para a quantificação, a intenção foi utilizar uma técnica analítica versátil, simples e adequada às concentrações presentes dos elementos nas amostras. No caso específico dos elementos essenciais Fe e Zn, foi empregada a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e, para os elementos contaminantes Cd e Pb, a espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS). Com essa junção de estratégias, teores dos elementos relacionados ao caráter nutricional ou de eventuais contaminações poderiam ser determinados, trazendo maior segurança alimentar.

Capítulo 3:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 - Espectrometria de absorção atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) é das técnicas mais bem estabelecidas no campo da análise instrumental. Devido a sua seletividade e relativa simplicidade, está presente em muitos laboratórios, sendo utilizada para determinações de rotina de traços e constituintes maiores. De maneira simplificada, o princípio analítico da AAS é o da detecção qualitativa ou determinação quantitativa de elementos através da absorção da radiação por átomos livres em estado gasoso¹². Esse procedimento analítico aplicável teve seu advento com WALSH¹³, em 1955.

Uma vez que os elementos devem estar em sua forma livre e gasosa para poder absorver a radiação, uma fonte de energia deve ser empregada para a sua atomização. Esse processo, aliado à introdução da amostra, é dos mais importantes nas determinações por AAS, uma vez que está diretamente relacionado com a sensibilidade do método, tanto pela extensão da atomização, quanto pelo tempo de residência dos átomos no volume de observação. Essa fonte de energia para a atomização pode ser uma chama e, nesse caso, temos a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS, do inglês *Flame AAS*)¹².

Em FAAS, a solução a ser analisada é aspirada por um nebulizador pneumático e convertida em um aerossol, que é transportado para a chama. Usualmente, os nebulizadores mais empregados são aqueles que contam com uma câmara de pré-mistura, onde o aerossol é misturado com o gás comburente e oxidante antes de atingir o queimador. Nesse ponto, há a separação das gotas maiores, que vão para um dreno, das gotas menores, que efetivamente atingirão o queimador. Esse processo apresenta pouca eficiência e cerca de 5 a 10% apenas da solução inicialmente aspirada consegue atingir a chama¹⁴. No queimador, que geralmente proporciona uma chama de 5 a 10 cm de comprimento e poucos milímetros de largura, há a vaporização e atomização dos elementos, que poderão interagir com a radiação. Esse é um processo crítico em FAAS, uma vez que o tempo de permanência do analito na chama é curto, da ordem de milissegundos.

Porém, ainda que pequeno, esse tempo é suficiente para que haja a interação da radiação e sua absorção pelos átomos no volume de observação. Como essa absorção é diretamente relacionada com a quantidade de átomos presentes, conforme descrito pela lei de Lambert-Beer, há a possibilidade de quantificação do analito¹².

Pensando nas características de introdução pouco eficiente da amostra em FAAS e no baixo tempo de residência dos átomos na chama, GÁSPÁR e BERNDT¹⁵ propuseram uma forma de introdução total da amostra com o uso de um aerossol térmico e um tubo posicionado sobre a chama como câmara de atomização, para que, dessa forma, fosse aumentada a sensibilidade analítica em AAS. Com essa associação, foi criada a espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS, do inglês *Thermospray Flame Furnace AAS*). Esta técnica será discutida em detalhes no item 3.7 desta revisão.

3.2 - Elementos de interesse investigados nesse trabalho

3.2.1 - Elementos essenciais: Ferro e Zinco

O ferro é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre e possui caráter essencial para os seres humanos, estando presente em uma série de enzimas. Como exemplos, podemos citar as enzimas hemoglobina, presente no sangue, e a mioglobina, presente nos músculos. Dessa forma, é recomendada a ingestão de cerca de 10 a 30 mg de ferro por dia, que pode ser encontrado em alimentos como carnes, vísceras, verduras de cor verde escura, leguminosas e grãos integrais. As necessidades de ingestão de ferro são diferenciadas dependendo da fase de vida em que se encontra o indivíduo, como infância, idade adulta ou gravidez, por exemplo. Quando essa quantidade não é alcançada, a doença mais comumente manifestada é a anemia, que tem como sintomas a palidez, fadiga, tonturas, taquicardia e falta de ar. Como conseqüências da deficiência relacionada ao ferro, temos ainda uma maior possibilidade de partos

prematturos e com baixo peso ao nascimento, além de hipodesenvolvimento físico e mental¹⁶.

Outro elemento altamente essencial para os seres humanos é o zinco, que apresenta diversas funções bioquímicas, estando presente em cerca de 300 enzimas, como fosfatase alcalina, álcool desidrogenase e ácido ribonucléico polimerase. Muitas são as fontes de zinco, como carnes, organismos marinhos (ostras e camarões), grãos integrais, castanhas, cereais, legumes e tubérculos, sendo a ingestão recomendada de 10 a 20 mg por dia. Desse modo, evita-se um quadro de deficiência do metal, que é normalmente classificado como leve ou grave. No caso de uma deficiência leve, podem ocorrer alterações neurossensoriais, anorexia, diminuição no nível de testosterona, mortalidade materna e parto prematuro. Quando a deficiência é considerada grave, ocorrem dermatites, desordens emocionais como a depressão, baixa estatura e problemas de visão como cegueira noturna e fotofobia¹⁶.

3.2.2 - Elementos tóxicos: Cádmio e Chumbo

Os elementos tóxicos cádmio e chumbo são acumulados no organismo humano em órgãos como o fígado, devido à complexação dos metais na forma de enzima metalotioneína e também pela baixa taxa com que esse composto é eliminado. Quando no organismo, podem comprometer tanto o sistema cardiovascular e hematológico, sendo responsáveis pelo aumento da pressão arterial e anemia, respectivamente. Em outros sistemas, o cádmio pode causar enfisema se o sistema respiratório for afetado, osteoporose no caso do sistema esquelético, cálculos renais quando no sistema renal e alterações metabólicas no sistema hepático. O chumbo, por sua vez, pode comprometer o sistema hepático, causando hepatite e o sistema renal, provocando nefropatia crônica^{17,18}.

3.3 - Técnicas de preparo de amostras para alimentos

Dentre as etapas necessárias para a determinação de uma ou mais espécies químicas em um material, o pré-tratamento da amostra é das mais críticas. Nessa etapa, estima-se que ocorrem 30% dos erros associados à análise, muitas vezes relacionados com contaminações ou perdas do analito, por exemplo. Além disso, nessa etapa há um consumo alto de reagentes, o que aumenta os custos, e estimativas associam o preparo de amostras a cerca de 61% do tempo total gasto na análise. Atualmente, a intenção é, portanto, disponibilizar os analitos através de um pré-tratamento que permita a qualidade dos resultados em menor tempo e com um mínimo risco de contaminação, menor consumo de reagentes e geração de resíduos¹⁹.

Algumas técnicas analíticas possibilitam a determinação sem pré-tratamento ou com um pré-tratamento mínimo das amostras, como no caso da espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF, do inglês *X-ray Fluorescence*) ou a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS, do inglês *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*)²⁰. Em outras situações, a decomposição de amostras sólidas é uma parte importante em métodos analíticos, que geralmente necessitam de amostras na forma de soluções para as determinações. Esse é o caso de técnicas altamente sensíveis como a AAS ou a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)¹⁴.

Quando tratamos de amostras de interesse alimentício, existe uma grande necessidade de se conhecer a sua composição elementar, uma vez que esses dados se relacionam com aspectos nutricionais para os indivíduos. Além dos elementos essenciais, existem contaminantes que também necessitam ser quantificados e, nesses dois casos, muitas vezes esses elementos estão presentes em concentrações traço (níveis de µg/kg). Devido a essas baixas concentrações e à alta complexidade desse tipo de amostra, a correta escolha no pré-tratamento é imprescindível. Dentre as técnicas disponíveis para esse pré-tratamento, temos métodos de decomposição por via seca, por via úmida com emprego de energia térmica ou radiante e extrações com soluções extratoras e uso de ultra-som, por exemplo²¹.

3.4 - Métodos de decomposição das amostras por via seca e úmida

Os métodos de decomposição por via seca geralmente utilizam cerca de 0,1 a 1,0 g de amostra, que tem sua matéria orgânica decomposta por aquecimento em frascos abertos em forno mufla. As temperaturas utilizadas não costumam ser superiores a 550°C, sendo determinantes em casos onde os elementos de interesse são voláteis. Para acelerar o processo de decomposição ou mesmo evitar que perdas por volatilização ocorram, podem ser empregados agentes oxidantes como nitrato e óxido de magnésio. Assim, as cinzas resultantes podem ser dissolvidas em ácidos adequados e as análises podem ser desenvolvidas²¹.

No caso dos métodos de decomposição por via úmida, normalmente os procedimentos são realizados em frascos abertos, aquecidos em chapa de aquecimento ou blocos digestores, em bombas de digestão, que são frascos fechados de alta pressão, e também em fornos de microondas. Para a decomposição, são empregados ácidos de forma individual ou combinada (HCl, H₂SO₄, HNO₃, HF, entre outros) e agentes oxidantes como H₂O₂ ou misturas desses reagentes. No caso de sistemas abertos, o ponto de ebulição do ácido determina a temperatura máxima da decomposição²¹.

Utilizando esses conceitos, KIRA e MAIHARA²² realizaram a determinação de elementos maiores (0,25 a 100 mg/L) e traço em produtos derivados do leite por ICP OES após a decomposição por via seca. Para amostras de leite achocolatado, uma alíquota de 10 mL foi levada a um forno a 100°C para a secagem. Então, a temperatura foi aumentada à taxa de 50°C por min, até que se atingisse 450°C e essa temperatura foi mantida por 4 h. As cinzas foram dissolvidas com HCl 10% (v/v) a quente e o volume final foi ajustado para 25 mL. Para o caso das amostras de iogurte, 10 g foram pesados e secos a 100°C e o restante do procedimento foi idêntico ao aplicado ao leite achocolatado. Dessa forma, uma série de elementos puderam ser quantificados, com faixas de concentração de 0,04 ± 0,01 mg/kg (Cr em iogurte) a 1758 ± 29 mg/kg (K em leite achocolatado). De forma semelhante, os mesmos autores determinaram diversos elementos (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn) em queijo mussarela, minas, prato e parmesão por ICP OES²³. Nesse caso, cerca de 2 g das amostras liofilizadas foram incinerados em bico de Bunsen e levados à mufla com temperatura de 450°C. Esse processo foi

repetido até a destruição total da matéria orgânica. Por fim, as cinzas foram dissolvidas em 2,5 mL de HCl concentrado e o volume final foi ajustado para 25 mL. Dessa forma foram obtidas concentrações na faixa de $0,14 \pm 0,02$ (Cr em queijo minas) a 10551 ± 226 mg/kg (Ca no queijo parmesão).

OLSSON e OSKARSSON²⁴ utilizaram a decomposição por via seca para a determinação de Cd em rins bovinos e suínos. Inicialmente, a amostra foi pesada e seca a 103°C por 48 h. Então, procedeu-se a calcinação por 24 h a 103°C, sendo que ao final desse processo, 3 mL de água destilada e desionizada foram adicionadas e o processo de calcinação foi repetido. Essa etapa foi repetida até que toda a matéria orgânica fosse destruída. Nesse ponto, 5 mL de HCl 6 mol/L suprapuro foi adicionado e posteriormente evaporado em banho-maria. Por fim, o resíduo foi dissolvido com 5 mL de HNO₃ 10 mol/L e o volume final foi ajustado para 50 mL. Após esse tratamento, a concentração de Cd pôde ser determinada nas amostras por FAAS, com limite de detecção de 6 µg/L e concentrações médias de 0,575 e 0,244 mg/kg para o rim bovino e suíno, respectivamente.

A determinação de Ca, Mg, P e Zn em frações solúveis e micelares de iogurtes foi realizada após a calcinação em forno mufla²⁵. As frações foram obtidas por centrifugação e permaneceram resfriadas até o procedimento de digestão. Nesse ponto, realizou-se a secagem de 5 g de amostra em cadinhos de porcelana com o auxílio de chapa de aquecimento. Os cadinhos foram então transferidos para um forno mufla a 450°C, onde permaneceram por 24 h. Por fim, as cinzas foram dissolvidas com HNO₃ concentrado e água destilada e as determinações de Ca, Mg e Zn foram realizadas por FAAS e o elemento P foi determinado por espectrofotometria na região do visível. Desse modo, faixas de concentrações totais de 1090–2050, 101–177, 878–1560 e 4,0–7,3 mg/L foram obtidas para Ca, Mg, P e Zn, respectivamente.

A comparação de métodos de digestão por via úmida e seca na determinação de Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb e Zn em legumes foi realizada por MOMEN *et al.*²⁶. Os materiais certificados de folha de espinafre e repolho foram submetidos a três procedimentos distintos. O primeiro deles utilizou 0,5 g de amostra e uma mistura de 2 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂SO₄ concentrados. A mistura foi aquecida inicialmente a 125°C e a temperatura foi aumentada até que a completa digestão da amostra. Ao final, o resíduo foi dissolvido com auxílio de 2,5 mL de HCl e o volume foi ajustado em 50 mL. O segundo procedimento utilizado foi idêntico ao

anteriormente citado, porém foram utilizados 4 mL de HNO₃, 1 mL de H₂SO₄ e 1 mL de H₂O₂. Como terceiro método, foi empregada a digestão por via seca, onde cerca de 3 g de amostra foram calcinados em cadinho de porcelana com o uso de Mg(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂/HNO₃ como modificadores. A temperatura do conjunto foi mantida em 100°C até a secagem e, após isso, foi transferido para um forno mufla a 450°C por 2 a 3 h. O resíduo remanescente foi dissolvido com 2,5 mL de HCl e 1,5 mL de HNO₃, ambos concentrados, e o volume final foi ajustado para 50 mL com água desionizada. Então, as soluções foram analisadas por ICP OES e foram obtidos limites de detecção inferiores a 2,5 µg/g, com repetibilidade na faixa de 1,5 a 8,0%. Ao final, a comparação mostrou que as melhores condições de recuperação foram obtidas com o uso da mistura de reagentes HNO₃/H₂SO₄/H₂O₂, além de indicar também a calibração com adições de padrão às amostras como forma de evitar efeitos de interferência nas medidas.

CAVA-MONTESINOS *et al.*²⁷ utilizaram a radiação microondas de um forno residencial na digestão de amostras de leite de vaca para a determinação de concentrações ultratraço de Se e Te (11,1 a 26,0 e 1,0 a 9,7 ng/mL, respectivamente) por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS, do inglês *Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry*). Para tanto, cerca de 1 g de amostra foi seco em frasco de politetrafluoretileno (PTFE) por 2 h em forno com temperatura de 160°C. Após esse período, foi adicionado 1 mL de HNO₃ concentrado ao frasco, que foi fechado e levado ao forno microondas. Quatro ciclos de irradiação de 500 W de potência por 1 min foram empregados inicialmente, sendo que esses ciclos foram repetidos após a adição de 1 mL de H₂O₂ 30% (m/v). Nesse ponto, foi adicionado 0,5 g de ácido ascórbico para eliminar o excesso de HNO₃ e o volume foi ajustado para 50 mL para a determinação dos elementos. Com esse tratamento, foram obtidos limites de detecção de 0,005 e 0,015 ng/mL para Se e Te, respectivamente. Além dos baixos valores de concentração alcançados, o uso de radiação microondas proporcionou um menor tempo necessário para o preparo da amostra quando comparado com o método padrão de digestão por via seca. Com o mesmo procedimento, os autores determinaram As e Sb em leite, obtendo limites de detecção de 0,006 (As) e 0,003 ng/mL (Sb)²⁸. Para amostras comerciais de leite, as faixas de concentração obtidas foram de 3,4 a 11,6 e 3,5 a 11,9 ng/g para As e Sb, respectivamente.

Para a determinação das concentrações de Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn em 25 tipos de méis da Turquia, foram comparados procedimentos de preparo de amostras por digestão por via úmida, seca e com emprego de radiação microondas²⁹. Para a digestão por via seca, 1 g de amostra foi calcinada em forno a temperatura de 450°C por cerca de 8 h, sendo o resíduo dissolvido em 5 mL de HNO₃ 25% (v/v) e o volume final ajustado para 10 mL. No caso da digestão por via úmida, foram utilizados 12 mL de uma mistura 2:1 em volume de HNO₃ e H₂O₂ para 1 g de amostra. Essa mistura foi aquecida por 4 h até a secagem, quando o volume foi ajustado para 10 mL. Para o procedimento que utilizou radiação microondas, 1 g de amostra foi digerido com 3 mL de HNO₃ (concentrado) e 1 mL de H₂O₂ (30% m/v) conforme o seguinte programa: 2 min a 250 W, 2 min a 0 W, 6 min a 250 W, 5 min a 400 W, 8 min a 550 W e 8 min de ventilação. Dessa forma, os elementos Fe e Zn puderam ser quantificados por FAAS e os demais por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS, do inglês *Graphite Furnace AAS*), com valores de concentração de 1,8 a 10,2 µg/g para Fe, (o elemento mais abundante) e 0,9 a 17,9 µg/kg para Cd (o elemento menos abundante). Pela comparação dos resultados obtidos, o método de decomposição com emprego de radiação microondas foi o que apresentou os melhores valores de recuperação, seguidos da digestão por via úmida e pela digestão por via seca.

De forma semelhante, DEMIREL *et al.*³⁰ avaliaram os mesmos tipos de pré-tratamento de amostras para a quantificação de metais em uma série de alimentos, como molho de tomate, arroz, grão-de-bico, nozes, avelãs, sementes de abóbora, alho, pistache, cogumelos, carne bovina, carne de frango, leite, vinho tinto e cerveja. Para o método de digestão por via seca, cerca de 1 g de amostra foi calcinado em forno a temperatura de 450 a 500°C por cerca de 20 h, quando as cinzas foram dissolvidas em um volume de cerca de 1 a 2 mL de HNO₃ concentrado. Para a digestão por via úmida em chapa de aquecimento, cerca de 1 g de amostra foi utilizado, bem como 16 mL das seguintes misturas de reagentes concentrados: HNO₃/H₂O₂ (6:2), HNO₃/HCl (3:1), HNO₃/HCl (1:3) e HNO₃/H₂SO₄ (6:2). No caso da digestão com radiação microondas, a mesma situação do caso anterior para a massa de amostra e misturas de ácidos foi empregada, utilizando um frasco fechado de teflon e o seguinte programa de digestão: 2 min a 250 W, 2 min a 0 W, 6 min a 250 W, 5 min a 400 W, 8 min a 550 W e ventilação por 8 min. Dessa forma, os limites de detecção obtidos para os metais por FAAS foram de 0,013 mg/L para Cu;

0,019 mg/L para Zn; 0,011 mg/L para Fe e 0,010 mg/L para Mn. Os valores das massas características em GFAAS para os elementos foram de 17 e 22 pg para Al e Se, respectivamente. Dessa forma, as melhores condições de quantificação puderam ser observadas e foram conseguidas com o uso da mistura $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (6:2) e radiação microondas, que proporcionaram as melhores recuperações para os metais, principalmente para Se, que é um elemento volátil. Além disso, esse procedimento produziu resultados mais precisos e exigiu um menor tempo para a digestão.

Buscando um aumento na eficiência de decomposição de amostras de chás em forno de microondas com cavidade, SOYLAK *et al.*³¹ otimizaram as condições de digestão através de planejamento fatorial, onde as variáveis otimizadas foram a composição da mistura de ácidos, a potência das microondas e o tempo de irradiação. Como resultado desse planejamento, a condição ideal para a decomposição foi aquela que utilizou 6 mL de HNO_3 e 2 mL de H_2O_2 , ambos concentrados, potência de 550 W e tempo de irradiação de 8 min. Com isso, Cu, Zn e Ni puderam ser determinados por FAAS e as faixas de concentração para esses elementos nas amostras de chás foram de 6,4 a 13,1; 7,0 a 16,5 e 3,1 a 5,7 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. De forma similar, COSTA *et al.*³² otimizaram as condições de digestão de amostras de feijão em forno de microondas focalizado para a determinação de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES. As variáveis estudadas foram os volumes iniciais de HNO_3 (4,0 e 7,0 mL) e H_2SO_4 (1,0 e 3,0 mL) concentrados e a temperatura nos estágios de maior incidência de radiação microondas (170 e 200°C em ambos os casos). A quantidade de amostra utilizada foi de 500 mg e as tendências mais representativas foram aquelas que indicaram uma diminuição no volume inicial de H_2SO_4 para melhores recuperações para todos os elementos e o aumento do volume de HNO_3 e de H_2SO_4 , ou seja, da mistura ácida, para melhores recuperações para Fe, Mg e Mn. Dessa forma, com a otimização realizada o procedimento empregado pôde gerar resultados precisos e exatos.

A avaliação da ingestão diária de nutrientes e elementos tóxicos através da análise de alimentos foi realizada após a digestão das amostras em forno de microondas com cavidade³³. Uma série de alimentos servidos no café da manhã e almoço em restaurantes de hospitais, colégios, asilos e empresas, foram avaliados e os elementos foram determinados por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass*

Spectrometry). Para o preparo dos alimentos, uma massa de cerca de 0,2 e 1,0 g de amostra foi tratada com 3 mL de HNO₃, tendo o programa de digestão empregado 3 etapas: 20 min a 500 W, 10 min a 800 W e 20 min para resfriamento (0 W). Com isso, os elementos puderam ser determinados em faixas de concentração de 0,0003 a 0,027 mg/kg (Cd) a 1092 a 6241 mg/kg (K). Para Al, Sn, Cd, As, Sb, Hg e Pb, elementos que não são considerados essenciais, não houve nenhum caso em que estivessem acima dos limites estabelecidos por órgãos como a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), sendo a técnica adequada para avaliações de qualidade de alimentos.

Como forma de aumentar a sensibilidade nas determinações de Cd, Cr, Cu, Ni e Pb em amostras vegetais por ICP OES, BEZERRA *et al.*³⁴ desenvolveram um método de pré-concentração em fase sólida dos metais em coluna de Amberlite XAD-4 modificada com ácido dihidroxibenzóico (DHB). Assim, cerca de 0,4 g de amostras de guaraná e repolho foram digeridos com o auxílio de 4,0 mL de HNO₃ 1:1 (v/v) em sistema de digestão pressurizado, que foi aquecido por 16 h em forno a 170°C. Ao final da digestão, a solução resfriada teve o pH ajustado para 8 e os metais puderam ser pré-concentrados na coluna de DHB/XAD-4. Então, os analitos foram eluídos com HCl 1,0 mol/L e a determinação foi realizada por ICP OES. Com esse sistema, limites de detecção de 0,02 (Cd), 0,23 (Cu), 0,58 (Cr), 0,060 (Ni) e 0,54 µg/L (Pb) foram obtidos, mostrando-se o método sensível, simples e de baixo custo.

Em situações específicas, o uso direto das amostras é possível, como para algumas amostras líquidas. EL-HADRI *et al.*³⁵ determinaram As em refrigerantes, chás e sucos de frutas por HG-AFS apenas adicionando HCl e KI às amostras. Nesse caso, 8,5 mL de HCl concentrado e KI, suficiente para proporcionar uma concentração final de 0,1% (m/v), foram adicionados a um volume de 2 a 5 mL de suco de frutas, 20 mL de refrigerante do tipo cola ou 10 mL de chá e o volume final foi ajustado para 50 mL. Em seguida essa solução reagia em sistema de fluxo com a solução redutora de NaBH₄ para a geração do hidreto e determinação por fluorescência atômica. Os resultados foram comparados com o método padrão de digestão por via seca e os valores de recuperação (%) de As no refrigerante, chá e suco de fruta foram de 94 ± 5, 101 ± 9 e 94 ± 6, respectivamente. Além desses resultados com boa exatidão, a proposição da análise direta mostrou-se uma alternativa rápida.

3.5 - Extração (lixiviação) dos metais das amostras

Em determinadas situações, a simples lixiviação dos metais contidos na amostra de interesse é suficiente para a sua disponibilização em solução. Nesses casos, não há a necessidade de se destruir a matriz da amostra, mas apenas de romper ligações e/ou interações químicas. Essa extração é dependente do tipo de matriz e do elemento em estudo, o que implica em diferentes interações entre os compostos da amostra²¹. WIETESKA *et al.*³⁶ determinaram uma série de elementos, como Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Pb e Zn, em amostras vegetais utilizando extração e ácidos com diversas concentrações. Os autores utilizaram dois procedimentos distintos para a extração, sendo que o primeiro deles utilizou 0,5 g de amostra, 5 mL de HCl concentrado ou de HNO₃ diluído (1:5 v/v) e aquecimento a 90°C por 30 min. Ao final desse intervalo de tempo, a amostra foi filtrada e as determinações realizadas por GFAAS. O segundo procedimento utilizou a mesma massa de amostra e 2 mL de HF 40% (v/v), sendo que a mistura foi aquecida a 90°C até a secura. Nesse ponto, foi feita a adição de 5 mL de HCl concentrado ou de HNO₃ diluído (1:5 v/v) e o aquecimento foi realizado a 90°C por 30 min. Com o tratamento que não emprega HF, os resultados foram adequados para os elementos Zn, Cu, Ca, Mg, Pb e Cd. Para os elementos Al e Fe esse procedimento não proporcionou uma extração adequada, havendo a necessidade do uso de HF para a disponibilização quantitativa desses elementos. A faixa de concentração para os elementos analisados foi de $1,12 \pm 0,12$ (Cd) a 4470 ± 210 µg/g (Mg) e estão em concordância com os valores certificados e com aqueles obtidos pelas técnicas de comparação de digestão de amostra por via seca e úmida.

Como uma alternativa também rápida de pré-tratamento de amostras, temos a extração de metais assistida com ultra-som, que é baseada no efeito determinante da cavitação acústica. Nesse caso, bolhas são formadas e logo em seguida as mesmas entram em colapso, quando há um aumento localizado de temperatura (cerca de 5000 K) e de pressão (cerca de 10 GPa). O emprego dessa técnica proporciona uma alternativa que, além de rápida, é simples para o pré-tratamento de amostras. Há também um menor consumo de reagentes associado ao procedimento, uma vez que muitos deles utilizam ácidos diluídos, o que também contribuirá para menores valores de branco¹⁹.

MANUTSEWEE *et al.*³⁷ determinaram Cd e Cu por GFAAS, além de Zn por FAAS em amostras de peixe e mexilhão após extração com ultra-som. Nesse caso, foram investigados o efeito da concentração de HNO₃, HCl e de H₂O₂, volume de solução e tempo de extração. A melhor situação alcançada foi aquela que, para uma massa de amostra de 0,2 g, utilizou um tempo de sonicação em banho de ultra-som de 30 min, com temperatura de 56°C e 6 mL de solução 1:1:1 de HNO₃ (4 mol/L), HCl (4 mol/L) e H₂O₂ (0,5 mol/L). Dessa forma, limites de detecção de 0,41; 2,56 e 0,01 µg/L foram obtidos para Cd, Cu e Zn, respectivamente. As recuperações no material certificado de músculo de cação foram de 80,9% para Cu e de 87,2% para Zn, sendo que para Cd o método não apresentou bons resultados. Outro procedimento rápido, facilmente aplicável e de baixo custo foi proposto para a determinação de Ca, Mg, Mn e Zn em plantas por FAAS após extração ultrassônica³⁸. Para tanto, otimizações das condições de cavitação do banho ultra-som e de extração foram realizadas, já que fatores como concentração do ácido, tempo de sonicação e tamanho de partícula afetam diretamente a eficiência da extração. Dessa forma, 0,3 g de amostra (tamanho de partícula menor que 75 µm) foram misturadas com 15 mL de HNO₃ 0,14 mol/L e o conjunto foi submetido a 10 min de sonicação. Assim, recuperações na faixa de 96 a 102% foram obtidas para materiais certificados de folhas de macieira e espinafre, sendo que esses valores não diferem significativamente daqueles obtidos pelo método de comparação por digestão por via úmida em um nível de confiança de 95%.

FILGUEIRAS *et al.*³⁹ compararam o uso da extração de Mg, Mn e Zn com ultra-som com um procedimento que utiliza digestão assistida com radiação microondas. Com esse procedimento a determinação dos metais em amostras de plantas utilizadas na alimentação humana, como canela, noz-moscada, salsa, páprica doce, páprica picante e chá preto, pôde ser realizada por FAAS. Para a extração, em um tubo de centrífuga cerca de 0,1 g de amostra foi misturada com 5 mL de HCl 0,3% (v/v) e o conjunto permaneceu por 3 min submetido à sonicação. Ao final, o sobrenadante foi separado da fase sólida por centrifugação por 4 min a 4500 rpm e foram realizadas as determinações. Os limites de detecção obtidos foram de 0,10 (Mg), 1,26 (Mn) e 0,65 µg/g (Zn) e as faixas de concentração nas amostras para os metais foram de 1500 a 3000, 30 a 735 e 20 a 45 mg/g, respectivamente. Esses valores são concordantes com aqueles obtidos com digestão assistida com radiação microondas, sendo que a extração tem como vantagens a maior rapidez,

consumo de uma quantidade menor de reagentes, menor número de etapas e maior segurança. Outro exemplo da extração de metais em amostras de alimentos é o trabalho desenvolvido por DE-LEONARDIS *et al.*⁴⁰, no qual Cu e Fe são determinados por GFAAS após extração em HNO₃ diluído. Nesse caso, a uma alíquota de 2 a 3 g de óleos de oliva, soja e girassol foi adicionado 1 mL de HNO₃ 10% (v/v), sendo que o sistema foi acondicionado em banho a 50°C com agitação por 2 h. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada por 5 min a 3000 rpm e a fração aquosa pôde ser diretamente introduzida no amostrador do equipamento. Dessa forma, recuperações de 94 ± 23 e $97 \pm 12\%$ foram obtidas para Cu e Fe, respectivamente. A faixa de concentração obtida para os metais nas amostras foi de 1 a 14 (Cu) e 52 a 517 µg/kg (Fe).

Para a determinação de As, Se, Ni e V em peixes e alimentos marinhos por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS, do inglês *Electrothermal AAS*), foi realizada uma extração com emprego de ultra-som⁴¹. O procedimento utilizou 10 mg de amostra, com tamanho de partículas inferiores a 100 µm, 1,5 mL de solução extratora de HNO₃ (0,5 ou 3% v/v) e alta intensidade de ultra-som (50% de amplitude e tempo de 3 min). A solução resultante desse processo foi analisada diretamente, não havendo necessidade de centrifugação ou filtração, uma vez que as partículas decantam com facilidade. Com essa abordagem, faixas de concentração de 12,6 a 190 (As), 0,73 a 2,34 (Se), 2,94 a 46 (Ni) e 0,82 a 5,14 µg/g (V) foram encontradas em amostras diversas como pescada, camarão e mexilhão. Os limites de detecção em tecido seco foram de 0,6; 0,3; 0,2 e 0,4 µg/g para As, Se, Ni e V, respectivamente.

Como forma de aumentar a eficiência da lixiviação de metais em amostras de chás, BORKOWSKA-BURNECKA *et al.*⁴² adicionaram pequenas quantidades de surfatante às soluções extradoras. A intenção nesse caso é a de promover uma estabilização dos extratos e também assegurar que haja uma maior penetração da solução extratora na amostra sólida pelo uso do tensoativo. Assim, cerca de 0,3 a 0,5 g de amostra foi tratada com 25 mL de solução extratora e o conjunto foi mantido em banho ultra-som para sonicação por 40 min. Quatro surfatantes foram testados, sendo que a base da solução extratora consistia de HCl diluído (1,0 mol/L). As concentrações na solução foram as seguintes: 0,05% (v/v) para TritonX-100; 0,00025 mol/L para brometo de di-dodecildimetilamônio (DDAB) e 0,00028; 0,00090 e 0,0022 mol/L para brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Os

resultados de aumento de eficiência obtidos por ICP OES foram comparados com os resultados para a extração com solução de HCl sem surfatante, sendo o incremento na extração dependente do tipo de material da amostra e do tensoativo. Para os elementos Mn, Pb, Ni, recuperações quantitativas foram obtidas com o auxílio dos surfatantes, sendo que o seu uso não afeta as intensidades das linhas analíticas e parâmetros como temperatura de excitação em ICP OES.

Uma comparação do uso de extração de metais com ultra-som, análise direta de suspensões e digestão assistida por radiação microondas para a determinação de Cd, Cu e Pb em amostras biológicas foi desenvolvida por LIMA *et al.*⁴³. Nesse caso, cerca de 0,01 a 0,2 g de amostra e 2 mL de solução de HNO₃ de concentrações 0,05 a 10% v/v foram submetidas a sonicação com sonda de ultra-som por um período de 2 a 5 min. Após essa etapa, a fase líquida foi separada por centrifugação (5000 rpm por 5 min) e a determinação foi efetuada por ETAAS. As faixas de recuperação para os elementos foram de 95 a 105% para Cd, 90 a 101% para Cu e de 88 a 98% para Pb. O uso da extração tem como vantagem a preservação da vida útil do atomizador em ETAAS, uma vez que a matriz da amostra não é introduzida como quando se utiliza a análise direta da suspensão. Comparando-se os resultados da digestão com radiação microondas, nesse caso específico, os valores para a extração são mais precisos, uma vez que esse método apresenta uma menor possibilidade de contaminação.

Uma outra forma de promover a extração de elementos em uma amostra é o uso da radiação microondas⁴⁴. Nesse caso, amostras vegetais como cebola e espinafre foram tratadas com água, solução de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e de HCl (0,01; 0,10 e 1,0 mol/L). Para tanto, 0,6 g de amostra foram misturadas com 10 mL de solução extratora (água, EDTA ou HCl) em frasco de Teflon e submetidos ao seguinte programa de aquecimento: 5 min a 250 W, 10 min a 400 W, 5 min a 550 W e 5 min a 250 W. Ao final, uma filtração foi realizada e o sobrenadante pode ser analisado por ICP OES, sendo que para os elementos B, Ba, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr e Zn a extração com HCl apresentou resultados adequados quando da comparação com os valores de referência e com o procedimento de digestão com radiação microondas. O procedimento de extração com radiação microondas apresentou vantagens como simplicidade, rapidez e adequada reprodutibilidade, além do fato de que o uso de soluções de ácido diluído ou EDTA proporcionam um menor custo e risco de contaminação.

3.6 - Análise de merenda escolar

Apesar da grande importância da análise de alimentos servidos para crianças, que está relacionada à necessidade de nutrientes para o correto desenvolvimento desses indivíduos, poucos foram os artigos encontrados com relação a esse tema durante a revisão bibliográfica. Na execução desta revisão bibliográfica foram utilizadas as palavras-chave *school meals* e *infant food*. Em determinados trabalhos, principalmente na área de saúde, a estimativa das concentrações de nutrientes é baseada em tabelas e bancos de dados. Esse é o caso do estudo dos alimentos e seu conteúdo nutricional de escolas em distritos do Mississippi⁴⁵ e em escolas em áreas de reservas indígenas nos estados de Arizona, Dakota do Sul e Novo México⁴⁶, todos nos Estados Unidos da América. O mesmo tipo de avaliação foi realizada em três escolas da Inglaterra, onde estudavam crianças de 9 a 15 anos⁴⁷. Nesses casos, através de descrições detalhadas dos alimentos e métodos de preparação, o conteúdo nutricional foi determinado com o uso de banco de dados eletrônico. Esse tipo de abordagem proporciona uma estimativa dos valores nutricionais.

Para valores mais exatos, é necessária a análise direta dos alimentos, como no trabalho desenvolvido por ROCA-DE-TOGORES *et al.*⁴⁸. Nesse caso, 29 amostras de cereais infantis foram analisadas para a investigação da presença de Cd e Pb. O pré-tratamento das amostras consistiu na digestão por via seca, onde 10 g de cereais foram mantidos em fornos a 450°C, por intervalo de tempo de 24 a 48 h. Após esse período, para completar a digestão, foi adicionado 1 mL de HNO₃ concentrado e outro intervalo de aquecimento foi realizado. Por fim, as cinzas foram dissolvidas com 400 µL do mesmo ácido e o volume final foi levado a 10 mL, quando a determinação dos elementos pôde ser realizada por ETAAS. Os limites de detecção obtidos foram de 0,33 ng/g para Cd e 14,9 ng/g para Pb, com faixas de concentrações dos elementos nos produtos de 2,9 a 40 e 36,1 a 598,3 ng/g, respectivamente. Um abordagem semelhante foi realizada por FRONTELA *et al.*⁴⁹, porém nesse caso a determinação foi realizada para os elementos essenciais Ca, Fe e Zn. As amostras, diversos tipos de cereais infantis disponíveis comercialmente, foram tratadas em forno a 525°C por 24 h, seguido da adição de 3 mL de HNO₃ concentrado e novo aquecimento até a secura da solução. Ao final, o resíduo foi

dissolvido com 1 mL de HCl concentrado e o volume final foi ajustado para 10 mL. Dessa forma, a concentração total dos elementos pôde ser determinada em FAAS, com recuperações no material de referência certificado de farinha de trigo integral de 100, 98 e 97% para Ca, Fe e Zn, respectivamente.

TINGGI *et al.*⁵⁰ analisaram uma série de alimentos servidos a crianças da cidade de Brisbane, Austrália. Para tanto, o método de digestão por via úmida foi utilizado como pré-tratamento das amostras, sendo que 1 a 2 g do alimento foi tratado com 12 mL de HNO₃ e 2 mL de H₂SO₄ concentrados e aquecimento até total digestão. Então, os elementos Cr e Mn puderam ser determinados por GFAAS e FAAS, com limites de detecção de Mn de 0,15 mg/kg e 1,10 µg/kg, para FAAS e GFAAS, respectivamente. Para o Cr, o limite foi de 1,0 µg/g (GFAAS).

Por fim, CÁMARA *et al.*⁵¹ estudaram a bioacessibilidade de Ca, Cu, Fe e Zn em merenda escolar, comparando os resultados de diálise e digestão simulada com enzimas. Para a determinação dos teores totais dos metais por FAAS, a matéria orgânica foi destruída em forno a 450°C por 48 h, seguida de adição de 3 mL de HNO₃ concentrado e mais 24 h de aquecimento a 450°C. Ao final, o resíduo foi dissolvido com 1 ml de HCl concentrado e o volume final foi ajustado para 10 mL. Dessa forma, os elementos puderam ser determinados por FAAS, sendo que as faixas de concentrações encontradas foram de 74,1 a 913 µg/g para Ca; 2,8 a 17,9 µg/g para Fe; 2,8 a 13,1 µg/g para Zn e 0,28 a 1,90 µg/g para Cu.

3.7 - Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS)

Em 2000, como alternativa para se aumentar a sensibilidade em sistemas de AAS, GÁSPÁR e BERNDT¹⁵ propuseram a utilização de um tubo atomizador posicionado sobre a chama de ar/acetileno do queimador de um espectrômetro convencional de FAAS. As amostras são introduzidas nesse tubo através de um capilar metálico aquecido pela própria chama do equipamento. Nessa nova técnica, denominada de espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS), foi possível a introdução completa da amostra e um tempo maior de residência da nuvem atômica no caminho óptico do

equipamento, da ordem de 134 ms. Essas modificações afetam diretamente a eficiência da nebulização, devido à introdução total da amostra, bem como a eficiência da atomização, causada pelo maior tempo disponível para a ocorrência dos fenômenos de vaporização. A introdução das amostras é realizada por uma bomba peristáltica que opera a baixa pressão, sendo a vazão do carregador uma das variáveis estudadas no trabalho. Além da vazão, do diâmetro do capilar e da sua composição, foram testados o volume de amostra e configurações do tubo (número de orifícios). Assim, limites de detecção menores que os normalmente obtidos por FAAS puderam ser alcançados para os elementos Cd, Cu, Hg, Pb e Tl. O aumento no poder de detecção da técnica foi de 14 vezes para Cu até 67 vezes para Hg. Em trabalho posterior, GÁSPÁR *et al.*⁵² utilizaram um capilar de sílica fundida para a vaporização e geração do aerossol térmico e um cilindro de gás com pressão de 1 MPa (10 bar) como meio de transporte das soluções das amostras. Desse modo, um volume de apenas 0,3 µL de solução de Pb, de concentração 5 µg/mL, pôde ser analisado com desvios padrão relativos da ordem de 3%. O limite de detecção encontrado nesse caso foi de 69 µg/L, valor 6,5 vezes melhor que em FAAS. Resultados semelhantes foram observados também para outros elementos, como Cd, Hg, Tl e Zn. Em 2003, DAVIES e BERNDT⁵³ seguiram otimizando parâmetros relacionados à TS-FF-AAS, como a composição do tubo atomizador e suas dimensões (diâmetro e espessura), a natureza do capilar cerâmico e a vazão do carregador. Nesses estudos, as melhores condições foram conseguidas para um tubo de níquel puro de 100 mm de comprimento, diâmetro interno (d.i.) de 10 mm e externo (d.e.) de 12 mm e com 6 orifícios na parte inferior, de 2 mm de diâmetro cada. O capilar com melhor resultado foi o de alumina não porosa de 100 mm de comprimento, com 0,5 mm d.i. e 2,0 mm d.e. e a melhor vazão foi a de 0,4 mL/min. Assim, Ag, As, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, In, K, Pb, Pd, Rb, Sb, Se, Te, Tl e Zn puderam ser determinados com sensibilidade de 3 a 100 vezes maiores que aquelas relacionadas a FAAS, sendo que os limites de detecção estão na faixa de 0,2 (Zn) a 310 µg/L (Se). Ainda relacionado à otimização, BERNDT e PULVERMACHER⁵⁴ utilizaram um fluxo de ar comprimido de baixa pressão (< 20 kPa) para o transporte da amostra como forma de simplificar o uso da TS-FF-AAS. Com o estudo das condições de operação, foi possível quantificar baixos níveis de concentração de Cd (0,005 a 0,3 µg/g) e Pb (0,1 a 2,0 µg/g) em amostras de pimentas. Além desses resultados, também foram obtidos baixos limites de detecção para Hg e Tl.

Como opção ao uso de chama acetileno-óxido nitroso para a determinação de Sn, foi proposta por LOBO *et al.*⁵⁵ a utilização da TS-FF-AAS com chama acetileno-ar. Essa proposta visava diminuir os efeitos de desgaste no espectrômetro causados pela alta temperatura da chama de acetileno-óxido nitroso, além do fato do comburente ter custo mais elevado que ar comprimido. Para tanto, foram otimizadas variáveis como vazão do carregador (ar), volume e concentração de HCl no padrão de 30 mg/L de Sn. Com isso, o limite de detecção para TS-FF-AAS (1,7 mg/L) foi 5 vezes menor que em FAAS (9,6 mg/L), o que faz da proposição inicial uma ótima alternativa para a quantificação do metal em baixas concentrações.

Visando um melhor entendimento das características dos tubos atomizadores utilizados em TS-FF-AAS, PETRUCCELLI *et al.*⁵⁶ utilizaram técnicas como XRF e microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) para a caracterização de tubos de níquel, titânio e de ligas metálicas. Para um melhor aproveitamento das informações obtidas por essas técnicas, foram empregadas ferramentas quimiométricas como análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e PCA de imagens. Com isso, puderam ser confirmadas correlações sobre a baixa vida útil de tubos de Ti (cerca de 5 horas) e a formação de TiO₂ durante as determinações. Ademais, foi demonstrado que tubos de níquel usados por longos períodos de tempo apresentam pequenas diferenças morfológicas quando comparados com tubos novos, o que explica sua alta reprodutibilidade mesmo após 88 h de uso ou 2648 determinações. Outra informação interessante do trabalho está relacionada ao aumento de sensibilidade para o elemento Cu quando do uso de tubos de Ti, da ordem de 2,5 vezes maior que quando se usa tubo de Ni, com limite de detecção de 6,5 µg/L.

Uma das situações mais críticas em TS-FF-AAS é a formação do aerossol térmico, já que isso afeta diretamente a sensibilidade da técnica. O mecanismo de sua formação a baixas vazões foi estudado através do uso de imagens geradas por uma câmera de alta resolução (18000 quadros/s)⁵⁷. Com esse recurso, foi possível observar um comportamento diferente do que aquele esperado para aerossóis formados por líquidos com altas pressões (pressões maiores que 1 MPa), onde existe uma distribuição contínua de gotas. Quando se trabalha a baixas vazões, como 0,4 mL/min, não existe a formação de grande quantidade de gotas, mas sim de um pulso líquido de natureza aleatória, onde gotas maiores são ejetadas para dentro do tubo atomizador. Essas gotas maiores são provavelmente formadas

devido ao efeito Leidenfrost. Esse efeito ocorre do contato de uma massa líquida com uma superfície com temperatura superior à sua temperatura de ebulição, quando uma camada de vapor é formada, isolando a massa líquida da fonte de calor e impedindo a sua rápida evaporação. Esse efeito ocorre no capilar cerâmico, formando as gotas maiores, bem como é, provavelmente, o responsável pela presença de gotas menores no interior do tubo após o choque das gotas maiores com a parede oposta. Dessa forma, comprova-se que há uma influência maior dos aspectos térmicos na formação do aerossol, como variações das altas temperaturas e o efeito Leidenfrost, do que os aspectos mecânicos anteriormente considerados.

3.8 - Uso da técnica de espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS)

Em 2002, considerando o ambiente altamente oxidante disponível no interior do tubo aquecido quando se utiliza HNO_3 , PEREIRA-FILHO *et al.*⁵⁸ propuseram a introdução direta de amostras biológicas na forma de suspensão para, então, promover a digestão simultânea desses materiais com a atomização dos analitos. Nesse caso, 300 μL de suspensões das amostras em meio de HNO_3 0,3 mol/L em diversas concentrações foram testadas (0,1 a 1,0%), sendo que nas análises de amostras de extrato de tomate, limites de detecção de 0,5; 4,3 e 3,5 $\mu\text{g/g}$ foram obtidos para Cd, Cu e Pb, respectivamente. Quando da aplicação do teste t não pareado para avaliação da exatidão com determinações em amostras de materiais certificados de referência, como rim suíno, fígado bovino, espinafre, folhas de cítricos e de tomateiro, comprovou-se que os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas com os valores certificados em um nível de confiança de 95%.

Com a intenção de aumentar ainda mais a sensibilidade, um sistema de pré-concentração foi desenvolvido por IVANOVA *et al.*⁵⁹ com o uso de uma coluna de cromatografia líquida de C_{18} . Nesse procedimento, um fluxo de ar comprimido impulsiona a amostra para a coluna, promovendo a pré-concentração do metal. Isso feito, um fluxo de ar introduz 500 μL do líquido eluente na coluna e, na seqüência, o metal eluído é introduzido diretamente no sistema de TS-FF-AAS.

Dessa associação, foram obtidos aumentos de sensibilidade em comparação com FAAS da ordem de 610 (Pb) e 1960 vezes (Cd), com limite de detecção de 0,17 (Pb) e 0,007 µg/L (Cd). Além disso, a quantificação desses elementos em materiais de referência como fígado bovino e folhas de pomar mostrou adequada concordância com os valores certificados.

Uma outra forma de se aumentar a sensibilidade nas determinações em TS-FF-AAS para Cd é a sua ligação com o complexante o, o-dietilditiofosfato de amônio (DDTP), como reportado por TARLEY e ARRUDA⁶⁰. O complexo formado é, então, adsorvido em uma espuma de poliuretano (PUF, do inglês *polyurethane foam*) para a pré-concentração, que é realizada em linha, e posterior eluição com uma solução 80% (v/v) de etanol. Com esse arranjo, pôde-se trabalhar numa faixa linear de 0,4 a 15,0 µg/L, sendo que o limite de detecção obtido foi da ordem de 0,12 µg/L. Esse limite de detecção é 5 vezes maior em TS-FF-AAS sem a pré-concentração. Utilizando o mesmo sistema descrito anteriormente, através do emprego de planejamento fatorial, variáveis como pH, vazão e concentração de DDTP puderam ser otimizadas e, então, os resultados obtidos puderam ser aplicados para a determinação de Cu. Dessa forma, TARLEY *et al.*⁶¹, conseguiram limite de detecção de 0,22 µg/L, com desvio padrão relativo de 1,1% para soluções contendo 30 µg/L do metal. A mesma metodologia foi empregada para Pb⁶², obtendo-se bons resultados na determinação do elemento em amostras de águas e vegetais, com limite de detecção de 1,5 µg/L. Nesse trabalho, ainda foram investigados possíveis efeitos de interferência no sinal de Pb por outros metais que também complexam com o DDTP, como Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Mn e Zn. Foi mostrado que concentrações maiores que 5 mg/L de Co, Cu e Ni, 10 mg/L de Cd, Mn e Zn e 100 mg/L de Fe apresentaram efeitos de interferência nas determinações.

De forma semelhante, PEREIRA *et al.*⁶³ complexaram Cd e Pb com pirrolidinoditiocarbamato de amônio (APDC) e, posteriormente, pré-concentraram o metal pela adsorção do complexo em 40 mg de uma mistura de fulerenos C₆₀ e C₇₀. Após a eluição, a quantificação foi realizada por TS-FF-AAS com aumento de sensibilidade em relação a FAAS de cerca de 675 e 200 vezes para Cd e Pb, respectivamente. Para a estimativa da exatidão, foram utilizadas amostras de água naturais e com a adição dos metais, bem como materiais certificados de centeio e rim suíno. Nessas situações, limites de detecção de 0,1 (Cd) e 2,4 µg/L (Pb) foram obtidos, com desvios padrão relativos menores que 4,5% (n = 10). Nesse trabalho,

os valores foram concordantes com os obtidos pela técnica de ETAAS. Um método similar foi empregado para a determinação de Cd⁶⁴, com a pré-concentração sendo realizada em uma minicoluna preenchida com bagaço de uva, um adsorvente natural, e eluição com HCl 1 mol/L. Foi obtido um limite de detecção de 0,03 µg/L e os valores encontrados nos materiais de referência (centeio, farinha e pão integral) estão em concordância com os valores certificados em nível de confiança de 95%.

Um outro sistema de pré-concentração, que utiliza nanomaterial, mostrou-se eficiente para a determinação de Cd por TS-FF-AAS⁶⁵. A adsorção altamente seletiva do metal por nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *Multiwall Carbon Nanotubes*), sem a necessidade de complexação, proporcionou um aumento de 51 vezes no fator de pré-concentração e a obtenção de limites de detecção e quantificação de 11,4 e 38,1 ng/L, sendo esse método adequado para a análise de amostras de águas e fumos.

A complexação de Cd em fluxo em uma coluna de Amberlite XAD-2 impregnada com 2-(2-tiazolilazo)-5-dimetilaminofenol (TAM) e posterior eluição com HCl 1,0 mol/L foi a estratégia adotada para a quantificação do metal em níveis ultratraço por TS-FF-AAS⁶⁶. Com essa configuração, um limite de detecção de 8,0 ng/L foi obtido e o metal pôde ser determinado com adequada concordância em amostras de referência de folhas de macieira, de pomar e farinha de arroz.

Sem utilizar técnicas de preparo de amostra que fossem adequadas para o aumento de sensibilidade da técnica de TS-FF-AAS, NASCENTES *et al.*⁶⁷ obtiveram recuperações que variaram de 97,7 a 105,3% na determinação de Cu e Zn em amostras de leite que apenas foram diluídas em água ou soluções de aminas terciárias solúveis em água (CFA-C). Dessa forma, uma análise simples e rápida proporcionou valores de limites de detecção de 2,2 e 0,91 µg/L para Cu e Zn em meio aquoso, respectivamente. Esses valores são menores que aqueles conseguidos usualmente em FAAS. Em outro trabalho⁶⁸, amostras de cerveja foram degaseificadas e diluídas com HNO₃ 0,14 mol/L, sendo analisadas diretamente. Com isso, foram obtidos limites de detecção de 2,2; 18; 1,6 e 0,9 µg/L para Cu, Mn, Pb e Zn, respectivamente. Os valores foram comparados com os obtidos por GFAAS e não houve diferenças significativas entre eles em um nível de confiança de 95%.

Em 2005, visando a minimização da quantidade de amostra utilizada e de contaminação ou perdas no processo, o conceito de análise em mini-frascos foi aplicado na decomposição de três tipos de plantas medicinais, tanto em fornos de

microondas fechados como focalizados⁶⁹. Para isso, 5 mg de amostra e 400 µL de reagentes (HNO₃ concentrado e H₂O₂ 30% v/v) foram adicionados em minifrascos de polipropileno que foram submetidos à radiação microondas. Dessa forma, a quantificação de Cd pôde ser realizada por TS-FF-AAS utilizando-se pequenas quantidades de amostras e o limite de detecção nesse caso foi de 0,9 µg/L.

Em 2006, como forma de se contornar o problema relativo à baixa sensibilidade em determinações de Co devido à sua alta temperatura de atomização, foi proposto um método por DONATI *et al.*⁷⁰ que modifica o comportamento termoquímico do elemento, através da formação de compostos voláteis de Co. Inicialmente, uma extração do metal com HCl 1,0 mol/L foi realizada e, então, o metal foi submetido a um procedimento de pré-concentração por ponto nuvem. A melhor situação foi conseguida com o uso de APDC como complexante e Triton X-114 como surfatante, sendo obtido um limite de detecção de 2,1 µg/L. Efeitos de interferência no sinal do Co foram estudados para os elementos Al, Fe, Mn e Cu, sendo que apenas para os dois primeiros foi observada uma interferência negativa de 60 vezes. Esse fenômeno foi minimizado pelo uso da extração com HCl 1,0 mol/L, que extrai mais facilmente o metal de interesse que os concomitantes. A verificação da exatidão do método foi realizada com a quantificação do metal em amostras de referência de fígado bovino e de folhas de tomateiro, com resultados em concordância com os valores certificados em um nível de confiança de 95%.

No mesmo ano, WU *et al.*⁷¹ aplicaram a mesma estratégia, de pré-concentração por ponto nuvem, para a determinação de concentrações ultratraço de Cd em amostras de águas e urina. As diferenças essenciais desse procedimento para aquele descrito por DONATI *et al.*⁷⁰ são a utilização de um tubo atomizador de quartzo e a mineralização das amostras de urina com radiação microondas ao invés da extração com ácidos diluídos. Dessa maneira, os resultados obtidos para o metal foram concordantes com aqueles obtidos pela técnica utilizada para comparação, ICP-MS. Com essas configurações, o limite de detecção de 0,04 µg/L foi obtido para um volume de amostra de 10 mL.

De forma similar, MATOS E ARRUDA⁷² utilizaram a mesma abordagem da derivatização para a criação de uma espécie volátil de Co e sua determinação em amostras ambientais, porém não foi realizada uma etapa de pré-concentração como no trabalho anteriormente citado. Para esse caso, a reação do metal com o complexante dietilditiocarbamato de sódio (DDTC) gera o composto volátil, que é

então determinado por TS-FF-AAS. Com a otimização de parâmetros como pH, concentração e volume do complexante, volume de amostra, composição da chama e configuração do tubo atomizador, foi conseguido um aumento no poder de detecção de 17 vezes quando comparado com FAAS e limite de detecção de 7 µg/L. Os resultados obtidos para os materiais de referência de sedimento de lago e sedimento marinho mostraram uma adequada concordância com os valores certificados, não havendo diferenças significativas em um nível de confiança de 95%.

Posteriormente, COELHO *et al.*⁷³ utilizaram a técnica de pré-concentração por ponto nuvem com 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) como complexante e Triton X-114 como surfatante para a determinação multielementar seqüencial de Cd, Cu e Pb. Nesse caso, as variáveis pH, concentração do tampão borato e volume de solução NaCl 1% (m/v) foram otimizadas e, dessa forma, fatores de enriquecimento na pré-concentração de 59, 25 e 21 foram obtidos para Cd, Cu e Pb, respectivamente. Os limites de detecção foram de 0,025 (Cd), 0,38 (Cu) e 0,43 µg/L (Pb), sendo que a repetibilidade, expressa pelo desvio padrão relativo, ficou entre 3,4 e 8,7% para os elementos. Por fim, os metais foram determinados por essa técnica em amostras de água mineral e, para se avaliar a exatidão do método, foram determinados em material de referência de elementos traço em água, com valores concordantes em nível de confiança de 95%.

GONZÁLEZ *et al.*⁷⁴ determinaram Cd, Pb e Zn em águas e sedimentos marinhos provenientes da Baía de Concepción e da enseada de Aysén, Chile, e os LD obtidos foram de 0,32; 2,6 e 0,21 µg/L, respectivamente. Em um outro trabalho, PEREIRA *et al.*⁷⁵ quantificaram Zn em amostras de chás por TS-FF-AAS⁷⁵, com a obtenção de limite de detecção de 10 µg/L e exatidão avaliada pela quantificação do metal em material de referência certificado, com resultados concordantes em nível de confiança de 95%.

Muitos trabalhos disponíveis na literatura reportam a utilização da TS-FF-AAS para a determinação dos elementos Cd, Pb, Zn, além de Co, Cu e Mn. A primeira comunicação de uma avaliação criteriosa sobre o comportamento do elemento Se foi desenvolvida em 2007 por ROSINI *et al.*⁷⁶. Nesse trabalho, foram otimizadas diversas variáveis que poderiam interferir nos valores das absorvâncias obtidas e, através desses estudos, foi escolhida uma chama oxidante, água como carregador e altura do queimador de 1,5 cm acima da chama. Além disso, foram

confirmados possíveis efeitos de interferência de elementos normalmente presentes em materiais biológicos, como Ca, K, Na e Mg. Dessa forma, optou-se por se utilizar a técnica de adições de padrão para a calibração, com a obtenção de limite de detecção de 8,7 µg/L, que representa um aumento de sensibilidade de 95 vezes quando comparado a FAAS. Para a avaliação da exatidão do método, materiais de referência de rim suíno e de mexilhão foram utilizados, sendo que os valores obtidos foram concordantes com aqueles certificados em um nível de confiança de 95%.

Outro metal pouco citado em TS-FF-AAS é a prata. Em trabalho publicado em 2008⁷⁷, o uso de extração por ponto nuvem com deslocamento de íons (D-CPE, do inglês *Displacement-Cloud Point Extraction*) se mostrou capaz de quantificar Ag de forma seletiva em amostras complexas, como solos, sedimentos marinhos e minério. A estratégia empregada se baseia na capacidade diferenciada de complexação do ligante dietilditiocarbamato de sódio (DDTC) com os metais. Em um primeiro passo, o ligante é coordenado com o metal Cu e, após separação de fases, a fase rica é utilizada para a extração da Ag, uma vez que a estabilidade do complexo Ag-DDTC é maior que para Cu-DDTC. Por fim, a nova fase rica contendo Ag é diluída com HNO₃ 10% (v/v) e metanol 20% (v/v), sendo então a concentração do metal determinada por TS-FF-AAS. Com esse arranjo, o limite de detecção obtido, de 0,2 µg/L, é comparável aqueles conseguidos por ICP OES e cerca de uma ordem de grandeza melhor que para FAAS.

Por fim, a associação de modelos de calibração multivariada com TS-FF-AAS foi desenvolvida por PETRUCELLI *et al.*⁷⁸ para a determinação de Cd e Pb em amostras de lodo de esgoto. Utilizando-se os perfis totais dos picos obtidos em 57 s de análise e, aplicando-se o método dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*), limites de detecção de 0,2 e 0,7 µg/kg foram obtidos para Cd e Pb, respectivamente. Esse tipo de calibração proporcionou limites 3 vezes menores que aqueles conseguidos quando foi empregada a calibração linear com soluções de padrão em meio aquoso. Dessa forma, houve boa concordância entre os valores certificados, das mineralizações e dos resultados do PLS, sendo que esse tipo de abordagem pode ser expandido para outros metais e amostras, principalmente em casos onde podem existir fortes efeitos de interferência por concomitantes.

Dessa forma, pode-se comprovar que a técnica é aplicável para determinações de diversos metais em variadas amostras de interesse ambiental, de

alimentos e em materiais biológicos, constituindo-se como uma alternativa viável para determinações em baixas concentrações dentre as técnicas espectrométricas.

Capítulo 4:

PARTE EXPERIMENTAL

4 - Parte Experimental

4.1 - Equipamentos e acessórios

As determinações de Cd, Fe, Pb e Zn foram efetuadas em um espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo Spectra AA640 (Varian, Austrália). Esse equipamento possuiu uma lâmpada de deutério para correção de sinais de fundo. O espectrômetro utiliza lâmpadas de catodo oco (HLC) como fonte de radiação (Varian) e em todas as determinações foi utilizada uma chama oxidante de ar (13,5 L/min) e acetileno (2,0 L/min). Os demais parâmetros instrumentais (como corrente da lâmpada e comprimentos de onda) utilizados foram aqueles recomendados pelo fabricante e são apresentados na Tabela 4.1.1.

TABELA 4.1.1. Condições experimentais para as medidas espectrométricas em absorção atômica para a determinação de Cd, Fe, Pb e Zn

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Resolução espectral (nm)	Corrente da lâmpada de catodo oco (mA)
Cd	228,8	0,5	4,0
Fe	248,3	0,2	10,0
Pb	283,3	1,0	10,0
Zn	213,9	1,0	5,0

Ferro e Zn foram determinados por FAAS enquanto que Cd e Pb, por TS-FF-AAS. As condições operacionais da TS-FF-AAS serão descritas na subseção 4.1.1.

Para o preparo das amostras foram utilizados um banho ultra-som modelo USC 1400 (Unique, Brasil), um agitador vortex modelo 37600 Mixer (Thermolyne, EUA), uma centrífuga modelo Hermle Z200A com força centrífuga relativa máxima de 4185 x g (Labnet, Alemanha), uma balança analítica modelo AS200 (Ohaus, Brasil), um jogo de peneiras (Bertel, Brasil) e um forno de microondas com cavidade modelo Ethos 1 (Milestone, Itália).

4.1.1 - Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS)

Um esquema ilustrativo da configuração do sistema da TS-FF-AAS é mostrado na Figura 4.1.1.1.

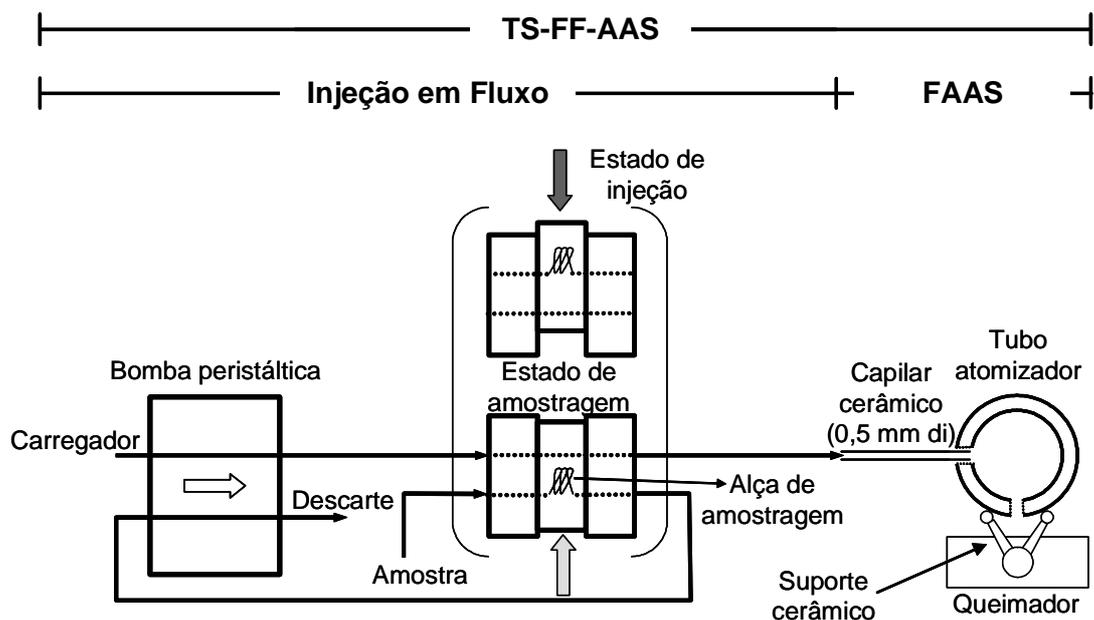


FIGURA 4.1.1.1. Esquema representativo da montagem do sistema da TS-FF-AAS

Para a montagem do sistema foi utilizado um suporte de aço inoxidável com quatro pinos cerâmicos. Esse suporte é adaptado sobre o queimador da chama de ar/acetileno original do espectrômetro e tem como função apoiar o tubo

atomizador. Além desse suporte, a TS-FF-AAS é formada por um sistema de propulsão e neste trabalho foi utilizada uma bomba peristáltica (Marca Ismatec, modelo MPC). Para a injeção das amostras, brancos e soluções padrão, foi utilizado um injetor comutador confeccionado em acrílico. Na configuração do sistema em fluxo foram utilizados tubos de propulsão e de extensão de Tygon (marca Cole-Parmer) cores amarelo/amarelo (1,37 mm d.i.) e vermelho/vermelho (1,14 mm d.i.), além de tubos de polipropileno com 0,75 mm d.i.

No desenvolvimento da parte experimental foram testados tubos atomizadores de níquel 200 e de Hastelloy 276c (ambos fornecidos pela empresa Camacam, Brasil), com 100 mm de comprimento, 10 mm de d.i. e 12 mm de d.e. e capilares cerâmicos de Al_2O_3 (Marca Friatec, Alemanha) não porosos de dimensões iguais a 100 mm de comprimento, 0,5 mm de d.i. e 2,0 mm de d.e.. A composição e as propriedades físicas dos tubos metálicos são apresentadas nas Tabelas 4.1.1.1 e 4.1.1.2, respectivamente⁷⁹.

TABELA 4.1.1.1. Composição das ligas de Hastelloy 276c e Níquel 200

Liga	Composição (%)					
	Ni	Cr	Fe	Mo	W	Cu
Hastelloy 276c	53	15	6	16	4	6
Níquel 200	99,0	-	0,40	-	-	0,25

TABELA 4.1.1.2. Propriedades físicas das ligas de Hastelloy 276c e Níquel 200

Propriedade física	Hastelloy 276c	Níquel 200
Densidade (g/cm^3)	8,9	8,9
Calor específico (J/gK)	0,47	0,47
Condutividade térmica (W/mK)	10,2	69,0
Ponto de fusão ($^{\circ}C$)	1347	1440

4.2 - Reagentes e soluções

Em todas as preparações de soluções foi utilizada água destilada e desionizada (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, EUA). As soluções de calibração foram preparadas após diluições sucessivas de soluções padrão de Cd, Fe, Pb e Zn de concentração 1000 mg/L (Merck, Alemanha). No preparo das soluções extratoras de concentrações 0,1 e 1,0 mol/L, foram utilizados HNO₃ e HCl concentrados (Merck).

4.3 - Amostras e materiais de referência certificados

As amostras utilizadas fazem parte da merenda de escolas da cidade de Campinas (Estado de São Paulo) e foram compostas de arroz com legumes (AL), carne com batatas (CB), carne com molho (CM), feijão (FJ), feijão com *Fegatelli* (FF) e *Fegatelli* (FG). Esses alimentos foram preparados seguindo-se os procedimentos convencionais de cocção e, então, liofilizados no Laboratório de Dietética da Faculdade de Nutrição da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas). Nesse mesmo laboratório foi desenvolvido o suplemento denominado *Fegatelli*, que é um caldo utilizado como fonte de Fe, Zn e vitaminas. Esse caldo é preparado refogando-se o fígado de aves com cebola e alho, sendo que, então, esse refogado é processado em liquidificador com leite e creme de leite. Nesse ponto, o suplemento está pronto para ser incorporado ao alimento ou pode ser congelado para posterior suplementação. Sua incorporação a alimentos como carne ou feijão é feita diretamente no momento do preparo.

Para se estimar a exatidão do método proposto, os elementos de interesse foram determinados em um material de referência certificado de fígado bovino (Bovine Liver - SRM 1577b). As concentrações certificadas (todas em mg/kg) de Cd, Fe, Pb e Zn são $0,50 \pm 0,03$; 184 ± 15 ; $0,129 \pm 0,004$ e 127 ± 16 , respectivamente.

4.4 - Descontaminação dos materiais

Previamente ao uso, todo o material empregado foi lavado com água e detergente, enxaguado com água destilada e colocado em banho de HCl (10% v/v) por 24 h. Após a retirada do banho ácido, o material foi lavado com água destilada e desionizada e deixado em capela de fluxo laminar (Veco, Brasil) para a secagem.

4.5 - Procedimento Experimental

4.5.1 - Otimização do sistema operacional da TS-FF-AAS

Para a obtenção de um melhor funcionamento do sistema e, conseqüentemente, de maior sensibilidade, foram investigadas as variáveis volume de amostra, vazão do carregador, tipo de tubo atomizador metálico e tipo de carregador. Para que essa otimização fosse realizada de forma mais eficiente e com maior aproveitamento dos resultados obtidos⁸⁰, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . A variável carregador foi obtida pela combinação das variáveis 1 (volume), 2 (vazão) e 3 (tubo) e em todos os experimentos foram utilizados 2 níveis (normalizados em -1 e +1). Os volumes de amostra utilizados foram 25 μL (-1) e 100 μL (+1), as vazões do carregador foram de 0,4 mL/min (-1) e 0,6 mL/min (+1), tubo de Ni-99% (-1) e de Hastelloy 276c (+1) e carregador H_2O (-1) e HNO_3 0,01% v/v (+1). A forma com que os experimentos foram realizados é mostrada na Tabela 4.5.1.1.

Desse modo, 8 experimentos foram realizados e para cada um deles foi construída uma curva de calibração de Zn (25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g/L}$), sendo que as respostas estudadas foram a inclinação da reta (a), o coeficiente de correlação (r), os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), além do desvio padrão relativo dos brancos (RSD). A escolha pelo uso de Zn nesses experimentos foi devida à intenção inicial de se determinar o elemento pela técnica de TS-FF-AAS.

TABELA 4.5.1.1. Experimentos realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a otimização das condições do sistema operacional da TS-FF-AAS

Experimento	Volume (1)	Vazão (2)	Tubo (3)	Carregador (123)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1

4.5.2 - Otimização das condições de extração dos metais nas amostras de alimentos

Na avaliação das melhores condições da extração dos metais utilizando ácidos diluídos, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} . Nesse caso, as variáveis estudadas foram a massa (variável 1) de amostra (100 e 200 mg, níveis -1 e +1, respectivamente), volume (2) de ácido (5 e 10 mL), concentração (3) do ácido (0,1 e 1,0 mol/L), tipo (4) de ácido (HCl e HNO₃), tipo de agitação da mistura amostra e solução extratora (vortex e ultra-som), tempo de agitação (5 e 10 min) e filtração (sem e com filtração). As variáveis tipo de agitação, tempo de agitação e filtração foram obtidas através da combinação das variáveis (123), (124) e (1234), respectivamente. A Tabela 4.5.2.1 mostra como os experimentos foram realizados.

TABELA 4.5.2.1. Experimentos realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} para a otimização das condições de extração dos metais nas amostras de alimentos

Experimento	Massa de amostra (1)	Volume de ácido (2)	Concentração do ácido (3)	Tipo de ácido (4)	Tipo de agitação (123)	Tempo de agitação (124)	Filtração (1234)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Com esse tratamento, as concentrações de Fe e Zn extraídas puderam ser obtidas por FAAS para cada um dos 16 experimentos e esses valores foram utilizados como a resposta do planejamento.

4.5.3 - Avaliação da extração dos metais em função do tamanho de partícula

Para a avaliação das condições de extração dos metais em função do tamanho das partículas das amostras, a amostra AL foi tratada em peneiras com tamanhos distintos de malha (106, 212 e 600 μm). A amostra AL original foi separada em três partes. A primeira parte foi manualmente moída e peneirada na peneira com 106 μm . A segunda e terceira partes foram também moídas e peneiradas nas peneiras com 212 e 600 μm , respectivamente. Desta forma, ao final deste processo foram obtidas três frações: tamanho de partícula \leq que 106 (fração 1), \leq que 212 μm (fração 2) e \leq que 600 μm (fração 3).

4.5.4 - Digestão das amostras por radiação microondas

Os resultados observados na extração foram comparados com aqueles obtidos na digestão assistida por radiação microondas. A massa de amostra utilizada foi igual a 250 mg e a essa massa foram adicionados 2 mL de HNO_3 concentrado e 1 mL de H_2O_2 30% (m/v). Então, um volume de 5 mL de água destilada e deionizada foi adicionado para se completar o volume mínimo recomendado pelo fabricante do equipamento (8 mL). Nesse ponto, as amostras e reagentes foram submetidos ao programa de digestão proposto por GOUVEIA *et al.*⁸¹, conforme indicado na Tabela 4.5.4.1.

Por fim, as amostras digeridas foram transferidas para frascos plásticos adequados, o volume final foi ajustado para 10 mL com água destilada e desionizada e as determinações dos metais foram realizadas.

TABELA 4.5.4.1. Programa de digestão assistida por radiação microondas empregado para a decomposição das amostras de alimentos

Etapa	Tempo de permanência nesta etapa (min)	Potência aplicada (W)
1	1	250
2	1	0
3	3	250
4	5	400
5	7,5	800
6	5	0

Capítulo 5:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte das informações deste capítulo foram publicadas no seguinte artigo científico:
Da-Col, J. A.; Domene, S. M. A. & Pereira-Filho, E. R. "Fast determination of Cd, Fe, Pb, and Zn in food using AAS". *Food Analytical Methods*, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-008-9041-4>

5 – Resultados e Discussão

5.1 - Otimização das condições operacionais da TS-FF-AAS

Para o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} foram construídas curvas de calibração para o elemento Zn com concentrações de 25 a 125 $\mu\text{g/L}$ e a Figura 5.1.1 (Partes 1 e 2) mostra os sinais analíticos das 5 soluções de calibração obtidos para os 8 experimentos. O Zn foi utilizado nesta otimização, pois inicialmente foi cogitada a utilização da TS-FF-AAS nestas determinações, mas suas determinações foram realizadas posteriormente por FAAS devido à concentração elevada do elemento nas amostras. Nesses resultados, é interessante comparar os sinais de 2 experimentos com perfis diferentes, o que está relacionado diretamente com o fato de que as variáveis do planejamento apresentam todos os seus níveis opostos. Para o experimento 4, o volume utilizado de amostra foi de 100 μL , vazão de 0,6 mL/min, tubo de Ni e carregador HNO_3 0,1% v/v e no experimento 5, volume de amostra de 25 μL , vazão de 0,4 mL/min, tubo de Hastelloy 276c e carregador H_2O . Nesta figura a escala do eixo y (absorbância) foi propositadamente igual em todos os casos, para facilitar a comparação dos dados.

Integrando-se a área sobre os picos, construiu-se então uma curva de calibração com os valores das absorbâncias integradas para cada um dos experimentos, sendo que as respostas utilizadas no planejamento puderam então ser avaliadas. A escolha por se trabalhar com curvas de calibração proporciona uma maior quantidade de informação, ou seja, de respostas para o planejamento experimental. Ao se utilizar esse tipo de abordagem, não apenas informações referentes às absorbâncias ou absorbâncias integradas podem ser obtidas, mas também podemos conseguir informações sobre a qualidade da curva de calibração construída, através da inclinação da reta (a) e do coeficiente de correlação (r), e sobre os LD e LQ, além dos valores para o SD dos brancos ($n = 10$).

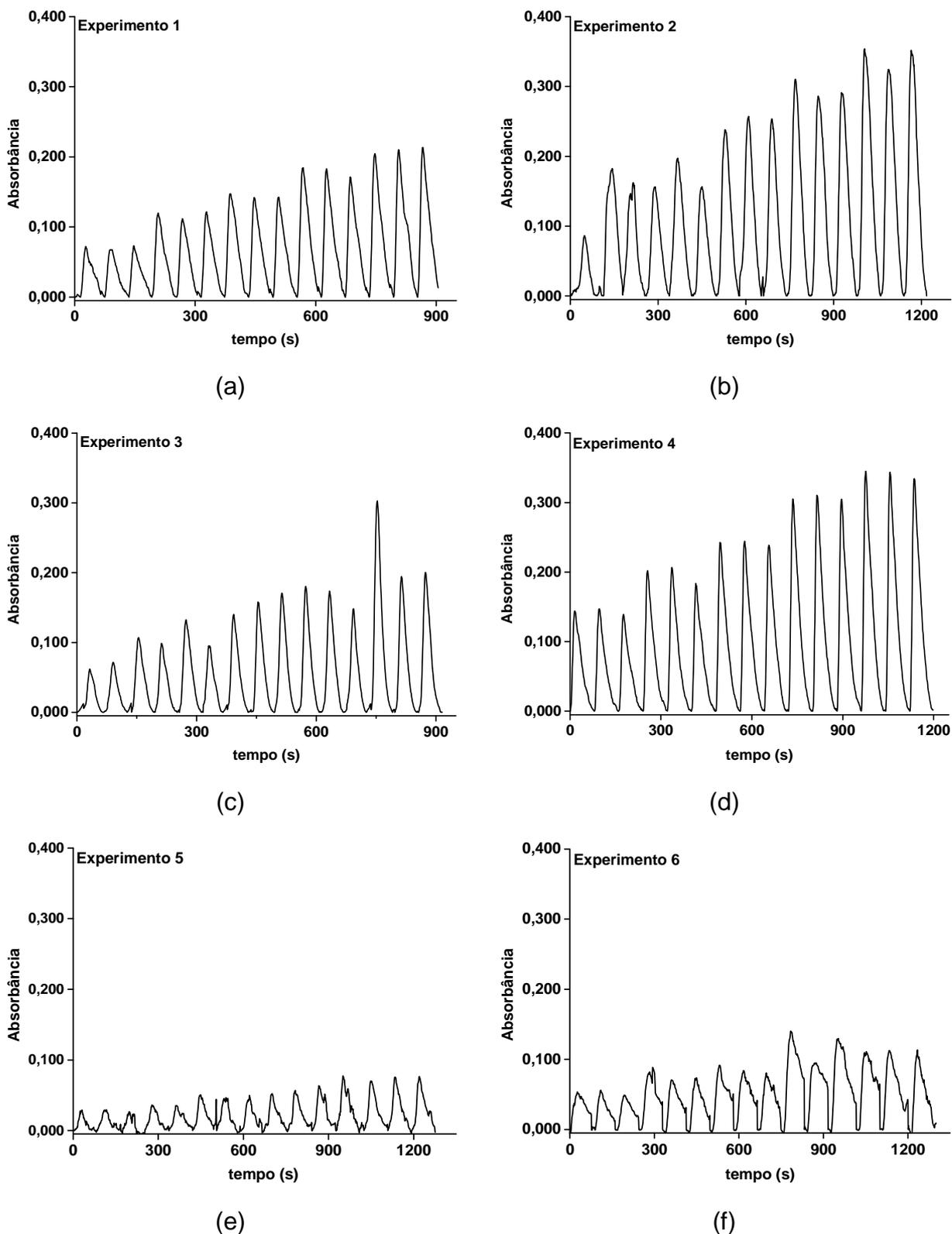


FIGURA 5.1.1. (Parte 1) Sinais analíticos dos padrões de Zn introduzidos em triplicata (25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g/L}$) obtidos no planejamento experimental para os experimentos 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e) e 6 (f)

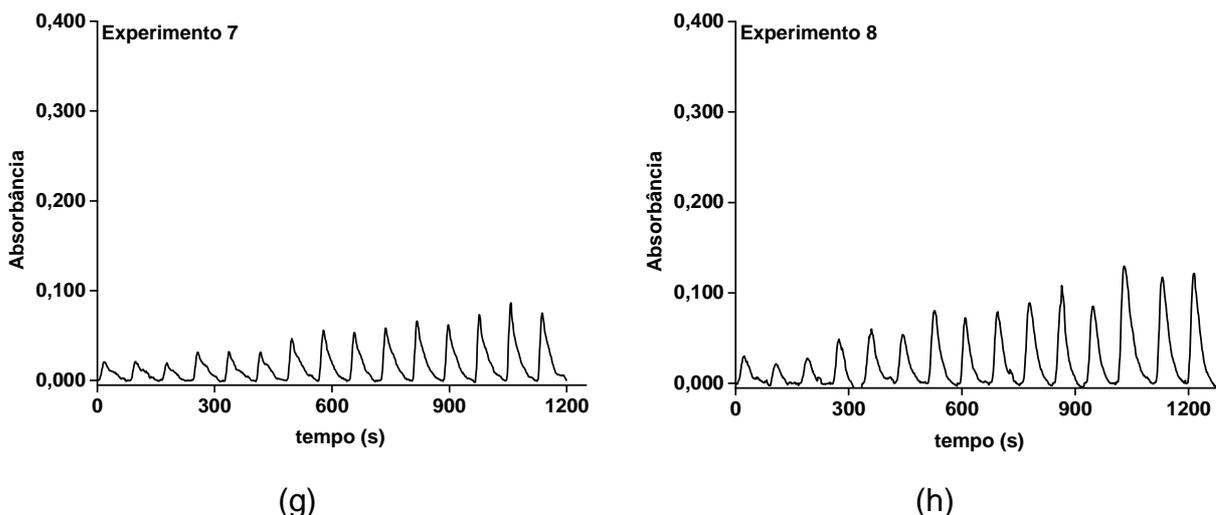


FIGURA 5.1.1. (Parte 2) Sinais analíticos dos padrões de Zn introduzidos em triplicata (25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g/L}$) obtidos no planejamento experimental para os experimentos 7 (g) e 8 (h)

5.1.1 - Avaliação da resposta inclinação da reta (a) para o planejamento experimental

Para se avaliar a resposta inclinação da reta (a), foi construído um gráfico de probabilidades com os valores calculados para os contrastes relativos a cada uma das variáveis e de suas interações no planejamento (Figura 5.1.1.1). Nesse gráfico podemos observar que as variáveis carregador (4) e vazão (2), além das combinações das quatro variáveis (12+34, 13+24 e 14+23), não apresentam contrastes significativos, com valores próximos a zero. Essa situação indica que, apesar das modificações nos níveis das variáveis, não existe uma variação apreciável na resposta associada. Um exemplo é a variação da vazão (2), cuja resposta é apenas $-0,01171 \text{ s}/\mu\text{g/L}$ quando se passa a usar $0,6 \text{ mL/min}$ (nível +1) ao invés de $0,4 \text{ mL/min}$ (nível -1). No caso da variável tubo atomizador, quando o material metálico utilizado é Hastelloy 276c, temos uma diminuição na inclinação de $0,03164 \text{ s}/\mu\text{g/L}$. Ao se comparar as propriedades físicas dos dois materiais constituintes dos tubos, nota-se que a diferença significativa está na condutividade térmica (ver detalhes na Tabela 4.1.1.2). A liga de Hastelloy 276c possui condutividade térmica de $10,2 \text{ W/mK}$, enquanto que o Níquel 200 possui $69,0 \text{ W/mK}$.

Essa maior capacidade de transferência de calor proporciona ao tubo de Ni uma melhor eficiência na geração do aerossol térmico, fenômeno altamente dependente das variações de temperatura e, conseqüentemente, do efeito Leidenfrost⁵⁷. Além disso, o Ni apresenta elevada resistência à corrosão em diversos meios, o que aumenta a vida útil do tubo atomizador. Portanto, para uma maior sensibilidade do método, deve-se empregar um tubo atomizador confeccionado de níquel.

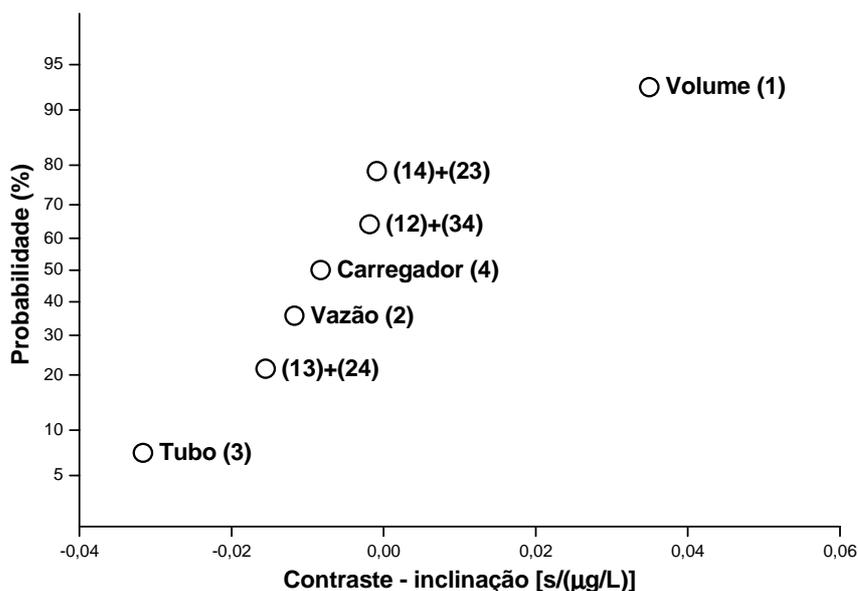


FIGURA 5.1.1.1. Gráfico de probabilidades para a resposta inclinação da reta (a)

O gráfico de probabilidades também indica que o uso de um volume maior de amostra, no caso 100 µL, proporciona um aumento de 0,03492 s/µg/L na inclinação da reta. Essa situação é causada por um conseqüente aumento na quantidade de analito que é introduzido no caminho óptico, o que aumenta a população atômica no volume interno do tubo⁶⁷. Porém, ao se aumentar o volume da amostra, há um decréscimo no número de determinações realizadas por hora, já que há um acréscimo no tempo necessário para a amostragem e aquisição dos sinais analíticos.

5.1.2 - Avaliação de forma univariada do efeito do volume de amostra na sensibilidade e freqüência analítica

Para se avaliar a extensão do ganho proporcionado pelo aumento do volume introduzido de amostra, bem como a sua implicação na freqüência analítica, foram realizados experimentos univariados. Nesse caso, as variáveis vazão (0,4 mL/min), carregador (HNO₃ 0,1%) e tubo (Ni) foram fixadas e foram realizados testes com volumes de amostra de 50, 100, 200 e 300 µL. Os valores das respostas obtidas através da análise dos sinais analíticos dos experimentos são mostrados na Tabela 5.1.2.1. Com base nesses valores, pode-se verificar que o volume de 200 µL apresentou os menores valores para RSD do branco (31%), LD e LQ (6 e 20 µg/L, respectivamente), além do maior valor do coeficiente de correlação para a reta (0,9981). No caso da inclinação, relacionada com a sensibilidade do método, o valor para 200 µL (0,1454 s/µg/L) foi inferior apenas aquele associado ao volume de 300 µL (0,2260 s/µg/L). Dessa forma, a escolha por um volume de amostra de 200 µL proporciona adequada sensibilidade para o método sem prejuízo para o número de determinações realizadas, que é de cerca de 28 determinações por hora. No caso do uso de um volume de 300 µL, o número de determinações realizadas seria de 27 por hora.

TABELA 5.1.2.1. Parâmetros analíticos obtidos nos experimentos univariados para os volumes de amostra de 50, 100, 200 e 300 µL

Experimento	Volume de amostra (µL)	RSD (%)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	a (s/µg/L)	r	Freqüência analítica
1	50	38	24	80	0,0577	0,9262	55
2	100	47	54	180	0,0826	0,9229	36
3	200	31	6	20	0,1454	0,9981	28
4	300	80	12	40	0,2260	0,9690	27

5.1.3 - Avaliação da resposta limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o planejamento experimental

Quando a resposta estudada é o limite de detecção (LD), o contraste mais significativo é aquele relacionado com a variável carregador (4). O uso de HNO_3 0,1% v/v pode causar a lixiviação de impurezas presentes no tubo metálico, levando a um aumento no valor do LD de $30 \mu\text{g/L}$ (Figura 5.1.3.1). Ademais, a presença de HNO_3 leva à formação de espécies NO_x , o que pode vir a modificar o ambiente químico no interior do tubo. Esses resultados podem ser expandidos para a variável limite de quantificação (LQ), que apresenta a mesma tendência observada. É importante observar que o valor de LD é 3 vezes o valor do desvio padrão dos brancos dividido pelo coeficiente angular da reta e que o valor de LQ é 10 vezes o valor do desvio padrão dos brancos dividido pelo coeficiente angular.

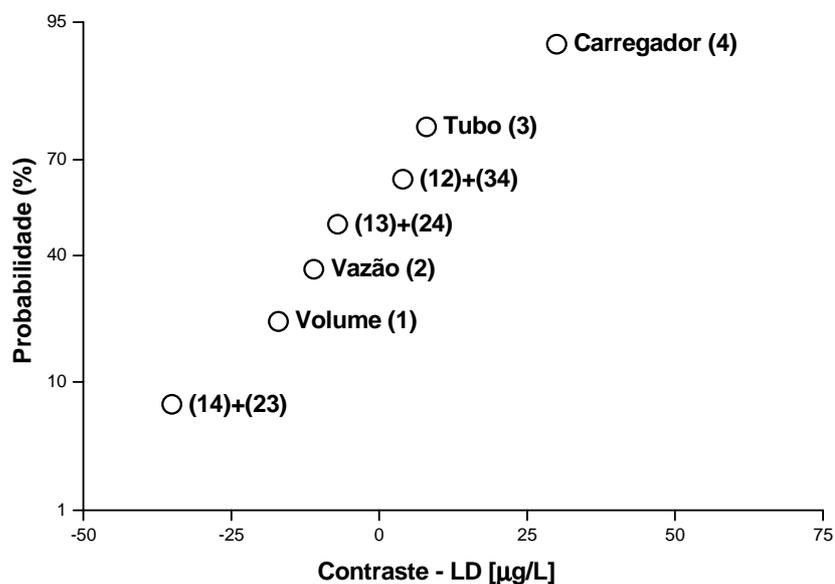


FIGURA 5.1.3.1. Gráfico de probabilidades para a resposta limite de detecção (LD)

5.1.4 - Avaliação de forma univariada da concentração de HNO₃ como carregador na sensibilidade do método

De forma análoga à investigação sobre o volume de amostra, experimentos univariados foram realizados para a avaliação da concentração de HNO₃ na solução do carregador. Fixadas as variáveis vazão (0,4 mL/min), tubo (Ni) e volume de amostra (200 µL), as concentrações do ácido utilizadas foram de $1,75 \times 10^{-3}$, $3,50 \times 10^{-3}$, $7,00 \times 10^{-3}$ e $1,40 \times 10^{-2}$ mol/L. Não foram observadas alterações significativas nos valores de RSD dos brancos, LD, LQ, a e r quando a concentração foi aumentada, como pode ser observado pelos valores das respostas para os experimentos (Tabela 5.1.2.2). Dessa forma, optou-se então por fixar a concentração de HNO₃ em 0,014 mol/L (0,1% v/v), uma vez que não há prejuízo para a eficiência do método, além dessa solução ácida auxiliar na limpeza do sistema de injeção das amostras. Dessa forma, além de se evitar entupimentos no sistema de introdução da amostra, evita-se também um eventual efeito de memória nas determinações.

TABELA 5.1.2.2. Respostas analíticas obtidas nos experimentos univariados para as concentrações de HNO₃ de 0,00175; 0,00350; 0,00700 e 0,0140 mol/L

Experimento	Concentração de HNO ₃ (mol/L)	RSD (%)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	a (s/µg/L)	r
1	0,00175	38	18	61	0,0952	0,9867
2	0,00350	20	12	40	0,0890	0,9902
3	0,00700	35	17	55	0,0907	0,9942
4	0,0140	19	8	26	0,0924	0,9866

5.1.5 - Avaliação da resposta desvio padrão relativo (RSD) para o planejamento experimental

A resposta desvio padrão relativo dos brancos (RSD, $n = 18$) indica duas tendências com relação às variáveis estudadas. Observando-se a Figura 5.1.5.1, nota-se que ao utilizar o tubo de Hastelloy 276c há um aumento de 143% no RSD dos brancos, muito provavelmente pela presença de impurezas nessa liga. Portanto, o uso de tubo de Ni proporciona desvios menores nas medidas efetuadas, uma vez que esse material possui menores quantidades de impurezas (ver detalhes na Tabela 4.1.1.1).

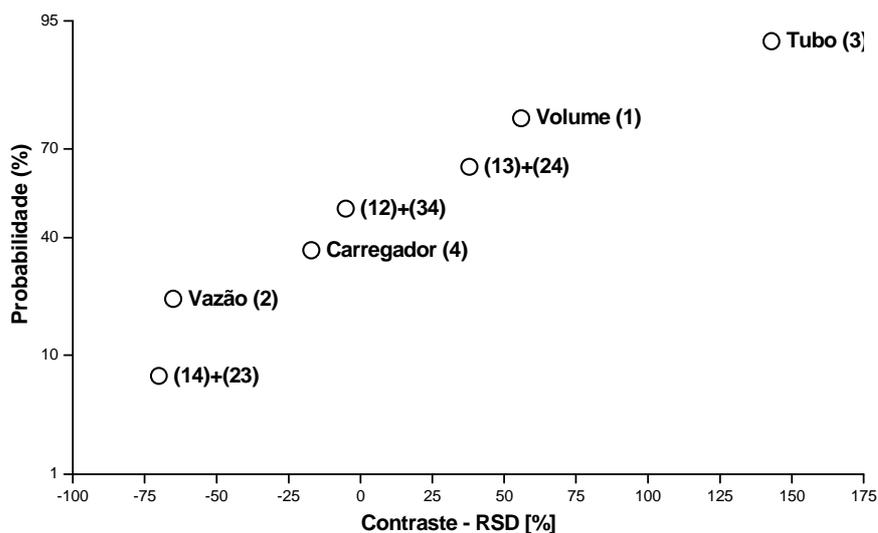


FIGURA 5.1.5.1. Gráfico de probabilidades para a resposta desvio padrão relativo dos brancos (RSD)

Por outro lado, o uso de uma vazão maior, nesse caso 0,6 mL/min, causa uma diminuição de 65% no valor de RSD para o branco. Essa situação pode ser correlacionada com a amplitude do ruído associado pela bomba peristáltica, que é diminuída com o uso de maiores vazões. Quando se utilizam vazões maiores, o tempo necessário para a vaporização no capilar cerâmico pode não ser suficiente, levando à formação de gotas de solução com tamanho maior. Essas gotas maiores, devido ao fenômeno Leidenfrost, permanecem por mais tempo na forma líquida, já

que existe um isolamento causado pelo vapor entre a gota e a parede do tubo. Embora a tendência apontada no planejamento seja do uso de uma maior vazão, a escolha final foi por uma vazão intermediária de 0,5 mL/min. Com isso, evita-se que, com o passar do tempo, a utilização de vazão superior leve a uma perda de eficiência na formação do aerossol térmico, devido ao resfriamento da extremidade do capilar cerâmico^{15, 57, 58}.

A análise dos contrastes associados à variável coeficiente de correlação (r) não proporcionou uma indicação de tendência que fosse significativa e, portanto, os resultados não foram levados em consideração na avaliação das melhores condições de operação do sistema da TS-FF-AAS.

Como situação ideal para a operação do sistema temos, portanto, as condições indicadas na Tabela 5.1.5.1.

TABELA 5.1.5.1. Condições ótimas para a operação do sistema de TS-FF-AAS

Condições otimizadas para o sistema	
Volume de amostragem	200 µL
Tipo de tubo atomizador	Níquel 200 (99%)
Vazão da bomba peristáltica	0,5 mL/min
Tipo de carregador	HNO ₃ 0,1% v/v

5.2 - Otimização das condições de extração dos metais com ácido diluído

Para a otimização das condições de extração dos metais nas amostras, foi realizado o planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} descrito na Tabela 4.5.2.1, que originou 16 experimentos. As amostras utilizadas nesses experimentos foram o suplemento alimentar, FG, e o CRM, sendo as respostas avaliadas as concentrações do elemento Zn nesses materiais. Para melhor visualização e

entendimento dos resultados, foi efetuada a normalização dos valores de concentração extraída. Para tanto, foi tomado o maior valor de concentração de Zn extraído como 100% e os demais valores foram então normalizados em função dessa concentração. Esse tipo de abordagem é possível uma vez que no planejamento as variações das concentrações com relação às mudanças dos níveis das variáveis fornecem maiores informações do que seus valores absolutos de concentração. No caso do Zn extraído no suplemento alimentar, um gráfico de probabilidades foi construído e os valores dos contrastes são apresentados na Figura 5.2.1.

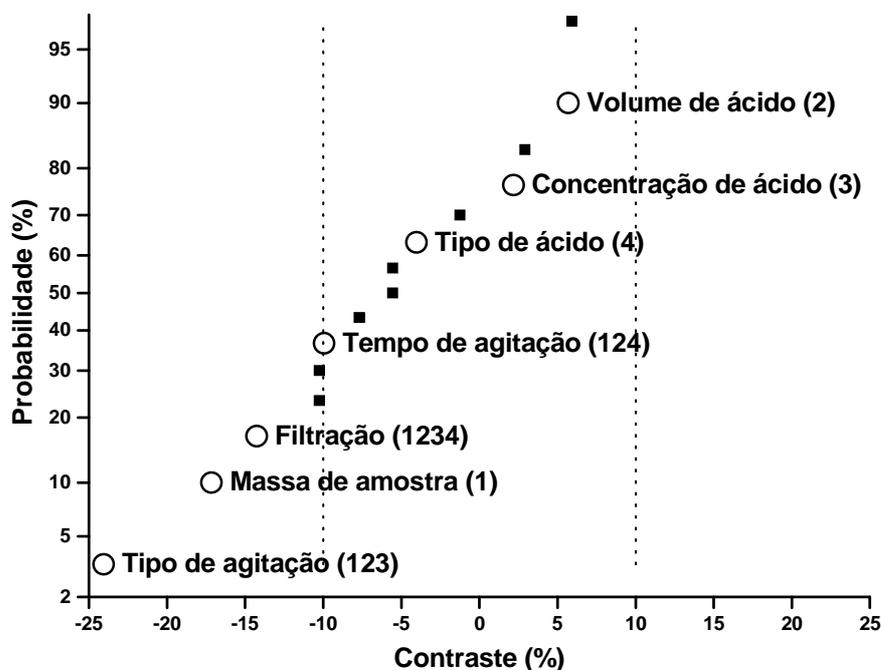


FIGURA 5.2.1. Gráfico de probabilidades para as concentrações normalizadas de Zn no suplemento alimentar.

Pela análise do gráfico, podemos notar que existe uma série de variáveis e interações de variáveis na região que corresponde a variações de concentração de -10 a 10%. Dentro dessa região, delimitada por linhas verticais pontilhadas, temos as variáveis volume (2), concentração (3) e tipo (4) do ácido, além do tempo de agitação (124). Dessa forma, modificações nos níveis dessas

variáveis não resultam em mudanças significativas na concentração do metal extraído e, portanto, a escolha dessas variáveis é dada pelos seus menores níveis, por uma questão prática. Assim, a opção é por utilizar 5 mL de HCl 0,1 mol/L e tempo de agitação de 5 min.

Para a variável massa de amostra, o uso de 200 mg do suplemento faz com que a extração do Zn seja diminuída em 17%, enquanto que o uso de ultra-som causa uma diminuição de 24%. Esses resultados podem ser explicados devido ao tipo de interação necessária para a extração do metal de interesse. Nesse caso, não há necessidade de se destruir a matriz da amostra para a disponibilização do analito, como quando se utiliza uma digestão. Na extração, a intenção é de apenas lixiviar o metal de interesse da matriz da amostra através da quebra de ligações químicas⁸². Portanto, o uso de uma menor quantidade de amostra faz com que a relação entre o volume de solução extratora e o material sólido seja aumentada, tendo como consequência uma maior capacidade de extração. Para que essa extração possa ser eficiente, o tipo de agitação é determinante, uma vez que sua função é proporcionar uma maior interação entre o ácido diluído e a amostra. O uso de banho ultra-som fornece, de forma pontual, uma grande energia para a solução⁸³, enquanto que a agitação com vortex promove uma constante agitação e interação entre a solução e a amostra. Essa situação explica o melhor resultado quando do uso de agitação por vortex.

Por fim, é observada uma diminuição de 14% na extração de Zn quando há a separação da solução extratora da amostra por filtração. Nesse caso, duas considerações podem ser feitas com relação ao resultado obtido. A diminuição da concentração do analito pode ocorrer por perdas durante o processo de filtração, como a adsorção do metal no papel de filtro utilizado. Outra possibilidade é a de partículas suspensas na solução sobrenadante serem arrastadas para o caminho óptico durante as determinações, resultando num valor de concentração maior do que aquele realmente contido na amostra. Para evitar que esses problemas interferissem nas determinações, a centrifugação das amostras foi incluída como uma etapa adicional. O uso desse processo, além de não ocasionar perdas ou contaminações, também proporciona a eliminação das partículas suspensas na solução. Com isso, a estratégia de preparo de amostras em frasco único e todas as vantagens associadas são alcançadas com esse procedimento analítico⁶⁹.

A avaliação dos resultados para o elemento Zn no CRM não levou a diferenças significativas, uma vez que as concentrações foram próximas em todos os experimentos, com valor médio extraído de 119 ± 5 mg/kg. A recuperação média para o elemento Zn no CRM foi de $94 \pm 5\%$.

Dessa forma, as melhores condições a serem utilizadas para a extração puderam ser determinadas pelos resultados da amostra FG e essas condições são mostradas na Tabela 5.2.1.

TABELA 5.2.1. Condições otimizadas para a extração de Zn na amostra FG

Condições otimizadas para a extração de Zn	
Massa de amostra	100 mg
Volume do ácido	5 mL
Tipo de ácido	HCl
Concentração do ácido	0,1 mol/L
Tempo de agitação	5 min
Tipo de agitação	vortex
Centrifugação (etapa adicional)	10 min (4000 rpm)

5.3 - Avaliação da extração de metais com relação ao tamanho das partículas das amostras

Para a avaliação da capacidade de extração do método proposto em função do tamanho das partículas, foram utilizadas amostras AL com dimensões menores que 106, 212 e 600 μm (conforme descrito no item 4.5.3). Esses valores são determinados pelos tamanhos máximos das malhas das peneiras utilizadas.

A Figura 5.3.1 mostra os perfis de variação de concentração para os metais Zn e Fe com relação ao tamanho de partícula nessa amostra.

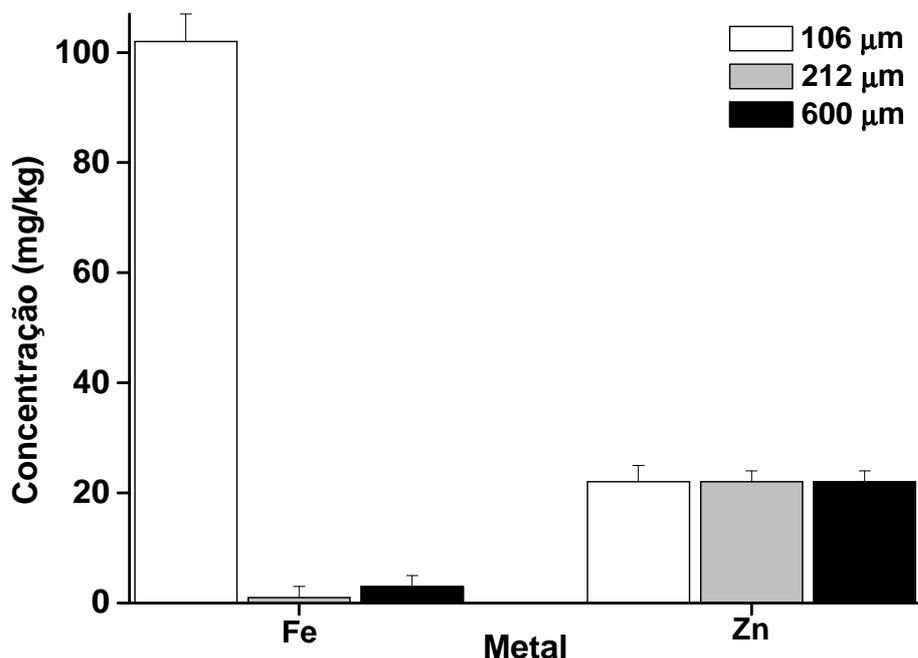


FIGURA 5.3.1. Influência do tamanho das partículas na capacidade de extração de Fe e Zn para a amostra AL

A extração de Fe mostrou-se altamente dependente do tamanho das partículas. Nas amostras de tamanho de partículas inferior a 600 μm , apenas 3,2 \pm 1,5 mg/kg de Fe pôde ser extraído, enquanto que naquelas com tamanho menor que 212 μm , a extração foi de 2,3 \pm 1,1 mg/kg. No caso das partículas menores que 106 μm , a extração apresentou uma eficiência da ordem de 44 vezes quando comparada com o pior caso (212 μm), com a quantificação de 102 \pm 5 mg/kg do metal. Esse comportamento é esperado, porém existe a possibilidade de contaminação da amostra por Fe, uma vez que as peneiras são confeccionadas em aço inox. Essa hipótese é pouco provável, uma vez que a tendência de incremento da concentração do metal não se repete em todas as faixas de tamanho de partículas estudadas.

Para o Zn, a extração não foi dependente do tamanho das partículas, ou melhor, não houve variação apreciável de concentração para o metal dentro da faixa estudada de tamanho. Nos três casos, a média para a extração de Zn foi de 22,2 \pm 2,8; 22,1 \pm 1,5 e 21,8 \pm 2,0 mg/kg, para os tamanhos 106, 212 e 600 μm , respectivamente. Vale salientar que estes experimentos foram feitos em triplicata ($n = 3$). Esses resultados devem ser atribuídos a diferenças na natureza das ligações

e/ou interações entre os metais e os compostos presentes na matriz da amostra, como proteínas e enzimas, por exemplo.

Para Cd e Pb, os valores obtidos nas frações de arroz foram inferiores aos LD (0,6 e 6 µg/L, respectivamente), não podendo ser quantificados e, portanto, não sendo possível estimar a influência do tamanho das partículas na extração desses metais.

5.4 - Quantificação dos metais nas amostras de merenda escolar

Foram empregadas para a quantificação dos metais nas diversas amostras de merenda escolar as condições otimizadas para o funcionamento da TS-FF-AAS e para a extração com ácido diluído, segundo as seções 5.1 e 5.2, respectivamente.

5.4.1 - Determinação de Pb nas amostras de alimentos

Na quantificação de Pb na merenda escolar, realizada por TS-FF-AAS, foram obtidos LD e LQ de 6,0 e 20 µg/L, respectivamente. Apesar dos valores dos limites serem baixos, não houve a possibilidade de detecção do elemento nas amostras e no material certificado. No CRM, o valor certificado para Pb é de $0,129 \pm 0,004$ mg/kg, um valor inferior ao que poderia ser obtido pelo método proposto. Considerando-se que a massa do material utilizado (100 mg) e o volume do ácido extrator (5 mL), através de um cálculo teórico, a concentração final do metal em solução seria de 2,58 µg/L.

Durante a determinação de Pb nas amostras, foi observada uma significativa variação nos sinais obtidos nas replicatas, indicando uma provável interferência causada por concomitantes, que também seriam extraídos durante o preparo das amostras. Para se averiguar a extensão desse fenômeno, foi realizada a adição do padrão de Pb no CRM, de modo que a concentração final do metal fosse de 200 µg/L. Ao se comparar o valor médio de absorvância para essas soluções

($0,0784 \pm 0,0147$) com o das soluções de padrão em meio aquoso ($0,0915 \pm 0,0017$), foi observada uma redução de 14,3% no sinal analítico. Em virtude dessa diminuição de absorbância, foi realizada a adição de padrão para todas as amostras, sendo as concentrações adicionadas de 0, 100, 200 e 250 $\mu\text{g/L}$ de Pb. Após as determinações, os valores das concentrações obtidas permaneceram abaixo do LD, não havendo a possibilidade de se quantificar o metal pelo procedimento analítico proposto. A mesma situação foi observada quando da análise das soluções provenientes da mineralização das amostras, onde os valores obtidos também ficaram abaixo do LD e LQ.

Esses resultados indicam a tendência de que não há presença de Pb nos alimentos, pelo fato dessas amostras não provirem de regiões com histórico de contaminação pelo metal, como demonstrado na Figura 5.4.1.1. Portanto, comprova-se a qualidade dos alimentos com relação à contaminação de Pb.

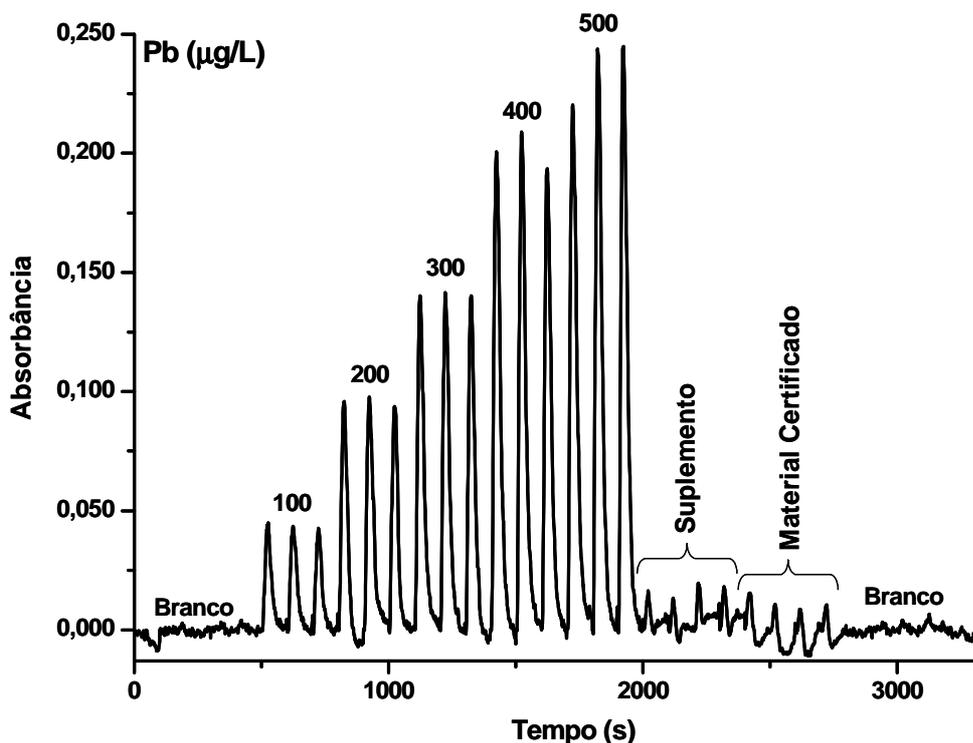


FIGURA 5.4.1.1. Exemplo de sinais transientes para soluções de padrão de Pb (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g/L}$), brancos, suplemento alimentar (FG) e CRM introduzidos em triplicata no sistema TS-FF-AAS

5.4.2 - Determinação de Cd nas amostras de alimentos

Na determinação de Cd, também realizada por TS-FF-AAS, foi obtido um LD de 0,6 µg/L e um LQ de 2,0 µg/L. Nas amostras de merenda escolar os valores obtidos foram inferiores aos limites anteriormente citados, mostrando que não há quantidades significativas do metal tóxico nesses alimentos. Para o CRM, através do cálculo teórico que leva em consideração a massa de amostra (100 mg), o volume final de ácido diluído empregado na extração (5 mL) e o valor certificado (0,50 ± 0,03 mg/kg), foi obtida uma concentração de cerca de 10 µg/L do metal em solução. O valor determinado por TS-FF-AAS é concordante com aquele obtido no cálculo teórico e essa situação é mostrada na Figura 5.4.2.1, onde temos o perfil dos sinais analíticos para os brancos, padrões, suplemento alimentar (FG) e CRM.

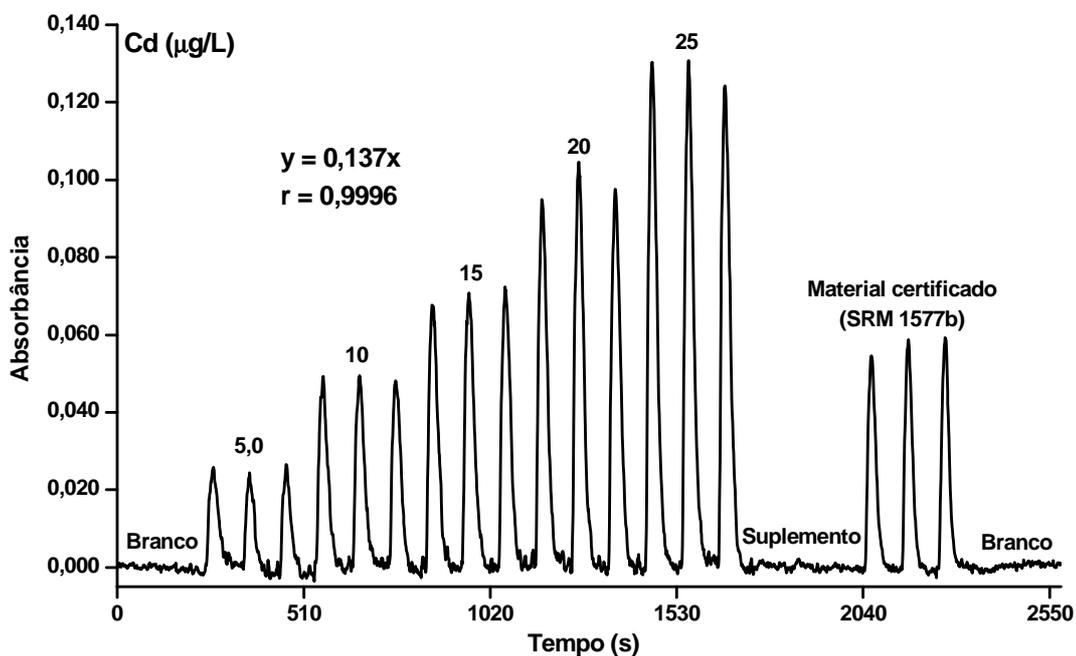


FIGURA 5.4.2.1. Exemplo de sinais transientes para soluções de padrão de Cd (5,0, 10, 15, 20 e 25 µg/L), brancos, suplemento alimentar (FG) e CRM introduzidos em triplicata no sistema TS-FF-AAS

Ao final das determinações, a concentração média obtida para Cd no CRM foi de $0,50 \pm 0,04$ mg/kg ($n = 14$), que é um valor compatível com o valor certificado. Através da realização do teste t não pareado, pode-se verificar que esses valores não apresentam diferenças significativas em um nível de confiança de 95%, já que o valor calculado para t de 0,011 é inferior ao tabelado 2,16 ($n = 13$, 95%)⁷⁹. Também foi calculada a recuperação de $100 \pm 7\%$, a repetibilidade de 3,8% ($n = 3$) para o material certificado, além da reprodutibilidade, que foi de 7,0% ($n = 14$).

Quando da análise das soluções provenientes da mineralização das amostras, foi observada uma baixa recuperação média de Cd no CRM, de apenas 48%. Essa dificuldade de se quantificar o metal é provavelmente devida à presença de elementos que interferem no sinal analítico, causando a sua supressão.

Segundo PEREIRA-FILHO⁸⁴, em determinações de Cd, Cu e Pb, a presença de interferentes como Ca, Mg, Na e K causou efeitos negativos quando a proporção analito:concomitante utilizada foi máxima, de 1:500000. Nesse caso, houve queda na absorvância da solução de 10 µg/L de Cd de 14 e 21% quando os concomitantes foram Mg e Na, respectivamente. Essa relação é maior do que aquelas encontradas em amostras reais. No caso do CRM utilizado nessa dissertação de mestrado, as proporções calculadas a partir dos valores certificados são de 1:230 (Cd:Ca), 1:1200 (Cd:Mg), 1:4800 (Cd:Na), 1:19800 (Cd:K) e 1:26000 (Cd:soma dos concomitantes). Porém, não se pode deixar de observar que os resultados obtidos nas simulações são baseados em soluções aquosas que contêm apenas o elemento de interesse e os concomitantes. Numa situação real, outras espécies estão presentes na solução digerida, podendo contribuir com um efeito negativo de interferência. Em dissertação de mestrado, DONATI⁸⁵ observou comportamento similar para determinações dos elementos Co e Cr, com tendência geral de diminuição dos sinais analíticos com o aumento da concentração dos concomitantes Al e, principalmente, Fe. A maior eficiência na introdução da amostra e a concentração dos elementos no interior do tubo metálico em TS-FF-AAS leva a uma alta relação analito:concomitante, que é provavelmente responsável por essa diminuição de sinal. Essa situação leva a uma alteração nos equilíbrios de vaporização, dissociação e atomização dos elementos, além da possível formação de óxidos e/ou carbeto refratários pela reação entre o analito, concomitantes e outras espécies presentes na amostra, já que o tempo de residência no tubo é suficiente para que essas reações e interações ocorram. SCHIAVO⁸⁶ observou a

mesma tendência para os elementos Co e Mn e os concomitantes Na, K, Ca, Mg, Fe, Al e Zn, com percentuais de interferência em FAAS de -24,4 a 5,5% e -62,4 a 17,5%, respectivamente. Em TS-FF-AAS, esses percentuais foram de -101 a 360% para Co e de -117,0 a 175,5% para Mn, o que confirma o aumento na interferência na técnica quando comparada com FAAS.

Dessa forma, quando da digestão das amostras, além do Cd, outras espécies que exerceriam um efeito de interferência são disponibilizadas, o que impossibilita a determinação do metal. Dessa forma é explicada a baixa recuperação média do metal, de apenas 48%. Na extração, como ocorre uma menor disponibilização dos elementos que interferem na determinação, bons resultados são observados para a quantificação de Cd em amostras de merenda escolar, sendo essa forma de pré-tratamento adequada para esse fim.

5.4.3 - Determinação de Zn nas amostras de alimentos

Para o Zn, com as determinações realizadas por FAAS, foi obtido um LD de 0,032 mg/L e LQ de 0,107 mg/L. Os valores encontrados para o metal nas diversas amostras de alimentos são apresentados na Tabela 5.4.3.1. A recuperação calculada para o CRM foi de 95% quando comparado com o Zn extraído, sendo que a repetibilidade foi de 2,0% (n = 3) e a reprodutibilidade, de 6,0% (n = 19). O valor calculado para o teste t não pareado, de 3,505, maior que o valor tabelado de 2,101 (18, 95%) mostra que, com este nível de confiança, há diferenças significativas entre os valores obtidos. Entretanto, com um nível de confiança de 99% temos valores concordantes.

Para efeito de comparação e avaliação da eficiência da extração, esses resultados foram comparados com os obtidos na digestão. Em todos os casos, existe uma tendência de que os valores de concentração na extração sejam ligeiramente superiores aos da digestão. Apesar dessa tendência, há grande concordância entre essas concentrações, o que indica que a extração é um procedimento de preparo de amostras adequado para a quantificação de Zn por FAAS em merenda escolar. O teste t pareado foi empregado para comparar o valor

de Zn certificado e o digerido e não foi observada diferença significativa em um nível de 95% de confiança.

TABELA 5.4.3.1. Valores de concentração (mg/kg) para Zn nas amostras de merenda escolar

Amostra	Extração		Digestão	
	Valor	n	Valor	n
Arroz com legumes (AL)	15 ± 1	3	14 ± 2	3
Carne com batatas (CB)	71 ± 1	3	63 ± 1	3
Carne com molho (CM)	129 ± 2	3	128 ± 5	3
Feijão (FJ)	36 ± 1	4	30 ± 2	3
Feijão com <i>Fegatelli</i> (FF)	32,5 ± 0,5	4	27 ± 1	3
<i>Fegatelli</i> (FG)	54 ± 9	4	54,2 ± 0,3	3
CRM (bovine liver - SRM 1577b)	123 ± 6	19	120 ± 5	3
Valor certificado	127 ± 16			

Em 1996, foi oficializado um convênio pelo Ministério da Saúde que visava fornecer dados de um grande número de nutrientes em alimentos nacionais e regionais e, dessa forma, teve início o projeto TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos). Coordenado pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA, Unicamp), laboratórios de competência analítica comprovada obtiveram informações sobre composição centesimal, vitaminas, minerais, ácidos graxos e colesterol para mais de 200 alimentos⁸⁷. Comparando-se os valores obtidos para Zn na amostra AL, podemos observar que esses valores são próximos daqueles indicados na tabela TACO⁸⁸ para o arroz tipo 1 cru, que é de 12 mg/kg. Esse mesmo tipo de proximidade entre os valores ocorre para a amostra FJ quando comparada com o valor de 29 mg/kg para o feijão carioca cru.

Também vale salientar que a função da amostra FG é a de suplementar a merenda escolar com Zn. Apesar dessa amostra ter uma concentração superior àquela presente no FJ (54 ± 9 e 36 ± 1 mg/kg, respectivamente), os resultados obtidos indicam que a suplementação não ocorre, uma vez que os valores encontrados na amostra FF ($32,5 \pm 0,5$ mg/kg) são inferiores aos do FJ. Para um melhor entendimento desse fenômeno, um estudo mais aprofundado dos procedimentos de preparo desses alimentos deve ser realizado.

5.4.4 - Determinação de Fe nas amostras de alimentos

Com relação ao elemento Fe, as determinações realizadas por FAAS apresentaram LD de 0,10 mg/L e LQ de 0,34 mg/L. Para as amostras AL, CB e CM, os valores encontrados na extração foram inferiores ao LD, não podendo, portanto, serem quantificados. Para as demais amostras, foi possível obter valores acima dos limites, como mostrado na Tabela 5.4.4.1.

Na extração, a recuperação de Fe no material certificado foi de apenas 69%, o que possivelmente ocorre devido a fatores como a alta dependência do tamanho de partículas na disponibilização do elemento. Esses resultados, quando comparados com os resultados obtidos da digestão, mostram que nos materiais de origem animal, como as amostras CB, CM, FG e CRM, a extração é menos eficiente. Na amostra FF, composta de alimentos tanto de origem animal como vegetal, existe certa concordância entre os valores da extração e digestão e, para a amostra exclusivamente de origem vegetal, FJ, os valores foram superiores para a extração. Essa situação comprova que, para esse tipo de amostra, existe uma alta dependência do tipo de matriz e da sua forma química com a capacidade de disponibilização do metal pela solução de ácido diluído.

Além disso, esses resultados também devem ser atribuídos ao comportamento da extração de Fe estar intimamente relacionada com o tamanho das partículas da amostra, conforme demonstrado na seção 5.3. Essas variações de tamanho de partículas podem ser responsáveis pelos altos valores de desvio padrão nas concentrações das extrações. Para as medidas realizadas após a mineralização,

os desvios apresentam uma magnitude significativamente menor quando comparados aos anteriormente citados.

TABELA 5.4.4.1. Valores de concentração (mg/kg) para Fe nas amostras de merenda escolar

Amostra	Extração		Digestão	
	Valor	n	Valor	n
Arroz com legumes (AL)	<0,10*	3	<0,10*	3
Carne com batatas (CB)	<0,10*	3	22 ± 5	3
Carne com molho (CM)	<0,10*	3	51 ± 6	3
Feijão (FJ)	94 ± 33	4	59 ± 6	3
Feijão com <i>Fegatelli</i> (FF)	69 ± 16	4	68 ± 5	3
<i>Fegatelli</i> (FG)	134 ± 17	4	196 ± 12	3
CRM (bovine liver - SRM 1577b)	126	1	168 ± 9	3
Valor certificado	184 ± 15			

*LD 0,10 mg/L

Uma baixa extração de Fe também foi observada por NASCENTES *et al.*³⁸, quando da determinação de Ca, Mg, Mn e Zn por FAAS após extração ultrassônica de amostras de vegetais. Para os demais elementos, as recuperações foram adequadas e ficaram compreendidas entre a faixa de 96 a 102%, porém para o elemento Fe a extração foi insuficiente e as recuperações não foram aceitáveis para a maior parte dos casos. Além dos aspectos relacionados à natureza da amostra, seja por sua composição ou tamanho das partículas, DONATI⁸⁵ também observou que o ácido extrator HCl possui uma menor capacidade de extração para íons trivalentes. Dessa forma, cátions como Al(III) e Fe(III) não são extraídos quantitativamente, possibilitando inclusive a resolução de interferências, o que também explicaria a baixa recuperação de Fe na extração proposta nessa

dissertação. A mesma situação ocorreu quando da extração dos metais com HCl concentrado ou HNO₃ diluído (1:5 v/v) em amostras vegetais. WIETESKA *et al.*³⁶ observaram que extrações quantitativas para Al e Fe só foram obtidas com o uso adicional de HF 40% (v/v).

Na digestão, a recuperação média do metal no material certificado foi de 91%, sendo que os valores obtidos são concordantes com o valor certificado em um nível de confiança de 95% (n = 3), uma vez que o valor de t calculado (3,026) no teste t não pareado é inferior ao valor tabelado (4,303).

Se calcularmos teoricamente o teor de Fe na amostra AL através do valor do LD (0,10 mg/L), da massa de arroz utilizada (100 mg) e do volume de ácido diluído empregado (5 mL), teríamos uma concentração mínima detectável de 5 mg/kg. Segundo o projeto TACO⁸⁸, o valor indicado para Fe no arroz tipo 1 cru é de apenas 7 mg/kg. Assumindo-se que esses valores correspondem a uma amostragem significativa de arrozes do país, isso explicaria a impossibilidade de quantificação do metal nesse alimento pelo método analítico proposto, já que esse valor de concentração estaria próximo do limite de detecção do método. Já para o caso do feijão, o valor da tabela TACO para o feijão carioca cru, de 80 mg/kg, está contido na faixa de valores obtidos na extração e digestão. Isso indica que o método é adequado para a quantificação do metal nesse tipo de alimento.

Da mesma forma como observado para o Zn, quando se estuda a concentração do feijão suplementado com a amostra FG, podemos verificar que não há um aumento na concentração do metal. A amostra FJ tem 59 ± 6 mg/kg de Fe enquanto que o suplemento apresenta 196 ± 12 mg/kg. Após a adição, a concentração na amostra FF passa para 68 ± 5 mg/kg, mostrando que a suplementação não incorporou significativamente Fe ao alimento.

Capítulo 6:
CONCLUSÕES

6 – Conclusões

O uso da espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS) para a determinação de Cd e Pb em amostras de alimentos se mostrou uma alternativa altamente adequada. A adaptação de um sistema de TS-FF-AAS em um espectrômetro de absorção atômica é relativamente simples e de baixo custo, necessitando apenas de um tubo de níquel, um suporte para esse tubo, um capilar cerâmico, um injetor comutador e uma bomba propulsora. Com esse arranjo, limitações clássicas da absorção atômica com chama como a introdução parcial da amostra, devida à baixa eficiência de nebulização, e o curto tempo de residência na chama são contornadas. Isso fica evidente com a observação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos, sendo que para Cd, os LD e LQ foram de 0,6 e 2,0 µg/L, respectivamente. Para o Pb, os limites foram de 6,0 e 20 µg/L, respectivamente. A repetibilidade nas determinações para Cd foi de 3,8% (n = 3) para o material certificado e a reprodutibilidade, de 7,0% (n = 14). Esses valores foram conseguidos com frequência de amostragem (preparo de amostra seguido da determinação) de 8 amostras por hora. Embora os valores de LD e LQ sejam baixos, nem sempre esses valores são compatíveis com as concentrações dos contaminantes, como ocorreu nas amostras de merenda escolar e de *Fegatelli*, onde as concentrações dos elementos foram inferiores. O aspecto positivo é que as amostras não apresentam quantidades apreciáveis de contaminantes, estando adequadas para o consumo no que se refere a Cd e Pb. Além disso, a durabilidade do tubo atomizador de níquel deve ser ressaltada, uma vez que, após o uso do mesmo tubo por 76 h (2270 determinações), não houve evidências de perda de sensibilidade nas determinações. Para elementos essenciais, as concentrações geralmente são mais elevadas, não sendo necessário o uso da TS-FF-AAS. Esse foi o caso dos elementos Fe e Zn, onde as concentrações puderam ser determinadas por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). Nesses casos, foram obtidos LD e LQ de 0,10 e 0,34 mg/L para Fe e 0,032 e 0,107 mg/L para Zn.

Com relação à extração dos metais com ácidos diluídos, esse procedimento se mostrou altamente dependente da natureza do metal e da matriz da amostra. Para Cd e Zn, os resultados foram compatíveis com os obtidos após a

mineralização assistida com radiação microondas. Nesses casos, o procedimento é uma alternativa viável para abreviar o tempo de análise, bem como os custos e o volume de resíduos gerados. Essa situação não ocorre para o elemento Fe, onde o tamanho das partículas da amostra está diretamente relacionado com a eficiência da extração. Essa situação exige que a amostra seja decomposta para a determinação do metal. Para o caso do Pb, nenhuma afirmação pôde ser realizada com relação a eficiência da extração, já que as concentrações do metal nas amostras e no material certificado foram inferiores ao LD.

A partir das otimizações realizadas nos procedimentos de extração e determinação dos metais, que proporcionaram as condições adequadas para a determinação dos metais nas amostras de alimentos, pudemos inferir algumas afirmações sobre a qualidade dos alimentos estudados. As amostras de merenda escolar não possuem concentrações de elementos tóxicos como Cd e Pb que causem preocupação, bem como o suplemento alimentar. Com relação à suplementação de nutrientes aos alimentos, os resultados mostram que o *Fegatelli* não é eficiente para a incorporação de Zn, já que as concentrações do metal em feijão apresentaram uma ligeira diminuição após a adição. Esse comportamento causa surpresa e maiores investigações acerca das condições de preparo dos alimentos devem ser efetuadas. Situação similar foi observada para o elemento Fe, uma vez que a incorporação do suplemento também não causou um acréscimo na concentração do metal em feijão. Apesar do valor de concentração não aumentar, poderia o Fe incorporado via suplemento ser mais biodisponível, já que é proveniente de proteínas de origem animal. O Fe ligado a proteínas animais é mais bem assimilado pelo organismo humano.

Capítulo 7:

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7 – Referências Bibliográficas

1. PROGRAMA FOME ZERO. <http://www.fomezero.gov.br>, acesso em 14/05/2008.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. <http://www.who.int/nutrition/databases/en>, acesso em 14/05/2008.
3. RAMALHO, A.; SARNI, R. O. S.; PASCHOAL, V.; VITOLO, M. R. & CINTRA, I. P. *Necessidades nutricionais de crianças e adolescentes*. São Paulo, International Life Sciences Institute do Brasil (ILSI Brasil), 2006.
4. ANVISA. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1679>, acesso em 14/05/2008.
5. FISBERG, M.; GIORGINI, E.; FERREIRA, A. M. A.; BRAGA, J. A. P.; VALLE, J. & PAULA, R. C. “The use of sweet rolls fortified with iron bis-glycinate chelate in the prevention of iron deficiency anemia in preschool children”. *Arch. Latinoam. Nutr.*, **51**(1): 48-53, 2001.
6. FISBERG, M. & PAULA, R. C. “The use of sugar fortified with iron tris-glycinate chelate in the prevention of iron deficiency anemia in preschool children”. *Arch. Latinoam. Nutr.*, **51**(1): 54-59, 2001.
7. TORRES, M. A. A.; LOBO, N. F.; SATO, K. & QUEIROZ, S. S. “Fortificação de leite fluido na prevenção e tratamento da anemia carencial ferropriva em crianças menores de 4 anos”. *Rev. Saúde Pública*, **30**(4): 350-357, 1996.
8. VIZEU, V. E. & FEIJÓ, M. B. S. “Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimistura”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **25**(2): 254-258, 2005.
9. BARBOSA, C. O.; LOPES, I. B. M.; MORGANO, M. A.; ARAÚJO, M. A. M. & MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. “Conteúdo de minerais dos ingredientes e da multimistura”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **26**(4): 916-920, 2006.
10. OLIVEIRA, S. M. S.; COSTA, M. J. C.; RIVERA, M. A. A.; SANTOS, L. M. P.; RIBEIRO, M. L. C.; SOARES, G. S. F.; ASCIUTTI, L. S. & COSTA, S. F. G. “Impacto da multimistura no estado nutricional de pré-escolares matriculados em creches”. *Rev. Nutr.*, **19**(2): 169-176, 2006.
11. MARIAM, I.; IQBAL, S. & NAGRA, S. A. “Distribution of some trace macrominerals in beef, mutton and poultry”. *Int. J. Agri. Biol.*, **6**(5): 816-820, 2004.
12. WELZ, B. & SPERLING, M. *Atomic absorption spectrometry*. 3^a ed., Weinheim, Wiley-VCH, 1999.
13. WALSH, A. “The application of atomic absorption spectrochemical analysis”. *Spectrochim. Acta*, **7**(2): 108-117, 1955.

14. VANDECASTEELE, C. & BLOCK, C. B. *Modern methods for trace element determination*. 1ª ed., Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 1997.
15. GÁSPÁR, A. & BERNDT, H. "Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) - a simple method for trace element determination with microsamples in the µg/l concentration range". *Spectrochim. Acta, Part B*, **55**(6): 587-597, 2000.
16. DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E. & MARCHINI, J. S. *Ciências nutricionais*. São Paulo, Sarvier Editora de Livros Médicos, 2003.
17. CARDOSO, L. M. N. & CHASIN, A. A. M. *Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos*. Salvador, Centro de Recursos Ambientais (CRA), 2001.
18. PAOLIELLO, M. M. B. & CHASIN, A. A. M. *Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos*. Salvador, Centro de Recursos Ambientais (CRA), 2001.
19. OLIVEIRA, E. "Sample preparation for atomic spectroscopy: evaluation and future trends". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**(2): 174-182, 2003.
20. KRUG, F. J. *Métodos de preparo de amostras, fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*. 1ª ed., Piracicaba, ed. por F. J. Krug, 2008.
21. KORN, M. G. A.; BOA-MORTE, E. S.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C.; SANTOS, E. B. G. N. & KORN, M. "Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - a review". *Appl. Spectros. Rev.*, **43**(2): 67-92, 2008.
22. KIRA, C. S. & MAIHARA, V. A. "Determination of major and minor elements in dairy products through inductively coupled plasma optical emission spectrometry after wet partial digestion and neutron activation analysis". *Food Chem.*, **100**(1): 390-395, 2007.
23. KIRA, C. S. & MAIHARA, V. A. "Determinação de elementos essenciais maiores e traço em queijos por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido após digestão parcial". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **27**(3): 446-450, 2007.
24. OLSSON, I. M. & OSKARSSON, A. "Sampling of kidneys from cattle and pigs for cadmium analysis". *Analyst*, **126**(1): 114-120, 2001.
25. DE-LA-FUENTE, M. A.; MONTES, F.; GUERRERO, G. & JUÁREZ, M. "Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts". *Food Chem.*, **80**(4): 573-578, 2003.
26. MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N. & STRATIS, J. A. "Investigation of four digestion procedures for multi-element determination of toxic and nutrient elements in legumes by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **565**(1): 81-88, 2006.

27. CAVA-MONTESINOS, P.; CERVERA, M. L.; PASTOR, A. & DE-LA-GUARDIA, M. "Hydride generation atomic fluorescence spectrometric determination of ultratracés of selenium and tellurium in cow milk". *Anal. Chim. Acta*, **481**(2): 291-300, 2003.
28. CAVA-MONTESINOS, P.; CERVERA, M. L.; PASTOR, A. & DE-LA-GUARDIA, M. "Determination of arsenic and antimony in milk by hydride generation atomic fluorescence spectrometry". *Talanta*, **60**(4): 787-799, 2003.
29. TUZEN, M.; SILICI, S.; MENDIL, D. & SOYLAK, M. "Trace element levels in honeys from different regions of Turkey". *Food Chem.*, **103**(2): 325-330, 2007.
30. DEMIREL, S.; TUZEN, M.; SARACOGLU, S. & SOYLAK, M. "Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials". *J. Hazard. Mater.*, **152**(3): 1020-1026, 2008.
31. SOYLAK, M.; TUZEN, M.; SOUZA, A. S.; KORN, M. G. A. & FERREIRA, S. L. C. "Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry". *J. Hazard. Mater.*, **149**(2): 264-268, 2007.
32. COSTA, L. M.; KORN, M. G. A.; CASTRO, J. T.; SANTOS, W. P. C.; CARVALHO, E. V. & NOGUEIRA, A. R. A. "Planejamento fatorial aplicado à digestão de amostras de feijão assistida por radiação microondas". *Quím. Nova*, **29**(1): 149-152, 2006.
33. NOËL, L.; LEBLANC, J. C. & GUÉRIN, T. "Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake". *Food Addit. Contam.*, **20**(1): 44-56, 2003.
34. BEZERRA, M. A.; SANTOS, W. N. L.; LEMOS, V. A.; KORN, M. G. A. & FERREIRA, S. L. C. "On-line system for preconcentration and determination of metals in vegetables by inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *J. Hazard. Mater.*, **148**(1-2): 334-339, 2007.
35. EL-HADRI, F.; MORALES-RUBIO, A. & DE-LA-GUARDIA, M. "Determination of total arsenic in soft drinks by hydride generation atomic fluorescence spectrometry". *Food Chem.*, **105**(3): 1195-1200, 2007.
36. WIETESKA, E.; ZIÓEK, A. & DRZEWIŃSKA, A. "Extraction as a method for preparation of vegetable samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **330**(2-3): 251-257, 1996.
37. MANUTSEWEE, N.; AEUNGMAITREPIROM, W.; VARANUSUPAKUL, P. & IMYIM, A. "Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after ultrasound-assisted acid leaching extraction". *Food Chem.*, **101**(2): 817-824, 2007.
38. NASCENTES, C. C.; KORN, M. & ARRUDA, M. A. Z. "A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables". *Microchem. J.*, **69**(1): 37-43, 2001.

39. FILGUEIRAS, A. V.; CAPELO, J. L.; LAVILLA, I. & BENDICHO, C. "Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **53**(2): 433-441, 2000.
40. DE-LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V. & DE-FELICE, M. "Cooper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted acid". *Int. J. Food Sci. Technol.*, **35**(4): 371-375, 2000.
41. LAVILLA, I.; VILAS, P. & BENDICHO, C. "Fast determination of arsenic, selenium, nickel and vanadium in fish and shellfish by electrothermal atomic absorption spectrometry following ultrasound-assisted extraction". *Food Chem.*, **106**(1): 403-409, 2008.
42. BORKOWSKA-BURNECKA, J.; JANKOWIAK, U.; ZYRNICKI, W. & WILK, K. A. "Effect of surfactant addition on ultrasonic leaching of trace elements from plant samples in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry". *Spectrochim. Acta, Part B*, **59**(4): 585-590, 2004.
43. LIMA, E. C.; BARBOSA-JÚNIOR, F.; KRUG, F. J.; SILVA, M. M. & VALE, M. G. R. "Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, cooper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**(8): 995-1000, 2000.
44. BORKOWSKA-BURNECKA, J. "Microwave assisted extraction for trace element analysis of plant materials by ICP-AES". *Fresen. J. Anal. Chem.*, **368**(6): 633-637, 2000.
45. ADDISON, C. C.; JENKINS, B. W.; WHITE, M. S. & YOUNG, L. "Examination of the food and nutrient content of school lunch menus of two school districts in Mississippi". *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **3**(3): 278-285, 2006.
46. STORY, M.; SNYDER, P.; ANLIKER, J.; CUNNINGHAM-SABO, L.; WEBER, J. L.; RING, K.; PLATERO, H. & STONE, E. J. "Nutrient content of school meals in elementary schools on american indian reservations". *J. Am. Diet. Assoc.*, **102**(2): 253-256, 2002.
47. BELDERSON, P.; HARVEY, I.; KIMBELL, R.; O'NEIL, J.; RUSSELL, J. & BARKER, M. E. "Does breakfast-club attendance affect schoolchildren's nutrient intake? A study of dietary intake at three schools". *Br. J. Nutr.*, **90**(6): 1003-1006, 2003.
48. ROCA-DE-TOGORES, M.; FARRÉ, R. & FRIGOLA, A. M. "Cadmium and lead in infant cereals - electrothermal-atomic absorption spectroscopic determination". *Sci. Total Environ.*, **234**(1-3): 197-201, 1999.
49. FRONTELA, C.; HARO, J. F.; ROS, G. & MARTÍNEZ, C. "Effect of dephytinization and follow-on formula addition on in vitro iron, calcium, and zinc availability from infant cereals". *J. Agric. Food Chem.*, **56**(10): 3805-3811, 2008.

50. TINGGI, U.; REILLY, C. & PATTERSON, C. "Determination of manganese and chromium in foods by atomic absorption spectrometry after wet digestion". *Food Chem.*, **60**(1): 123-128, 1997.
51. CÁMARA, F.; AMARO, M. A.; BARBERÁ, R. & CLEMENTE, G. "Bioaccessibility of minerals in school meals: comparison by dialysis and solubility methods". *Food Chem.*, **92**(3): 481-489, 2005.
52. GÁSPÁR, A.; SZÉLES, E. & BERNDT, H. "Analysis of submicroliter samples using micro thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**(1): 136-140, 2002.
53. DAVIES, J. & BERNDT, H. "Improvements in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Anal Chim. Acta*, **479**(2): 215-223, 2003.
54. BERNDT, H. & PULVERMACHER, E. "Sample introduction assisted by compressed air in flame furnace AAS: a simple and sensitive method for the determinations of toxic elements". *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**(8): 1826-1834, 2005.
55. LOBO, F. A.; VILLAFRANCA, A. C.; OLIVEIRA, A. P. & MORAES, M. "Sistema TS-FF-AAS com chama acetileno-ar como alternativa em relação à chama acetileno-óxido nitroso em FAAS na determinação de estanho". *Ecl. Quím.*, **30**(2): 61-68, 2005.
56. PETRUCCELLI, G. A.; STOCCO, P. K.; BUENO, M. I. M. S. & PEREIRA-FILHO, E. R. "Tube atomizers in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry: characterization using X-ray fluorescence, scanning electron microscopy and chemometrics". *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**(11), 1298-1304, 2006.
57. BRANCALION, M. L.; SABADINI, E. & ARRUDA, M. A. Z. "Description of the thermospray formed at low flow rate in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry based on high-speed images". *Anal. Chem.*, **79**(17): 6527-6533, 2007.
58. PEREIRA-FILHO, E. R.; BERNDT, H. & ARRUDA, M. A. Z. "Simultaneous sample digestion and determination of Cd, Cu and Pb in biological samples using thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) with slurry sample introduction". *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**(10): 1308-1315, 2002.
59. IVANOVA, E.; BERNDT, H. & PULVERMACHER, E. "Air driven on-line separation and preconcentration on a C₁₈ column coupled with thermospray flame furnace AAS for the determinations of cadmium and lead at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels". *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**(11): 1507-1509, 2004.
60. TARLEY, C. R. T. & ARRUDA, M. A. Z. "A sensitive method for cadmium determination using an on-line polyurethane foam preconcentration system and thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Anal. Sci.*, **20**(6): 961-966, 2004.

61. TARLEY, C. R. T.; FIGUEIREDO, E. C. & MATOS, G. D. "Thermospray flame furnace-AAS determinations of copper after on-line sorbent preconcentration using a system optimized by experimental designs". *Anal. Sci.*, **21**(11): 1337-1342, 2005.
62. TARLEY, C. R. T. & ARRUDA, M. A. Z. "Online coupling of a flow system to TS-FF-AAS for preconcentration and determination of lead in water and vegetables". *Anal. Lett.*, **38**(9): 1427-1443, 2005.
63. PEREIRA, M. G.; PEREIRA-FILHO, E. R.; BERNDT, H. & ARRUDA, M. A. Z. "Determination of cadmium and lead at low levels by using preconcentration at fullerene coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrochim. Acta, Part B*, **59**(4): 515-521, 2004.
64. MATOS, G. D. & ARRUDA, M. A. Z. "Online preconcentration / determination of cadmium using grape bagasse in a flow system coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrosc. Lett.*, **39**(6): 755-768, 2006.
65. TARLEY, C. R. T.; BARBOSA, A. F.; SEGATELLI, M. G.; FIGUEIREDO, E. C. & LUCAS, P. O. "Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd(II) determination at ng L^{-1} levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes". *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**(11): 1305-1313, 2006.
66. AMORIM, F. A. C. & BEZERRA, M. A. "Online preconcentration system for determining ultratrace amounts of Cd in vegetal samples using thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Microchim. Acta*, **159**(1): 183-189, 2007.
67. NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **64**(4): 912-917, 2004.
68. NASCENTES, C. C.; KAMOGAWA, M. Y.; FERNANDES, K. G.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrochim. Acta, Part B*, **60**(5): 749-753, 2005.
69. BRANCALION, M. L. & ARRUDA, M. A. Z. "Evaluation of medicinal plant decomposition efficiency using microwave ovens and mini-vials for Cd determination by TS-FF-AAS". *Microchim. Acta*, **150**(3): 283-290, 2005.
70. DONATI, G. L.; NASCENTES, C. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; ARRUDA, M. A. Z. & NÓBREGA, J. A. "Acid extraction and cloud point preconcentration as sample preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Microchem. J.*, **82**(2): 189-195, 2006.

71. WU, P.; ZHANG, Y.; LV, Y. & HOU, X. "Cloud point extraction-thermospray flame quartz furnace atomic absorption spectrometry for determination of ultratrace cadmium in water and urine". *Spectrochim. Acta, Part B*, **61**(12): 1310-1314, 2006.
72. MATOS, G. D. & ARRUDA, M. A. Z. "Improvements in cobalt determination by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry using an on-line derivatization strategy". *Talanta*, **76**(2): 475-478, 2008.
73. COELHO, L. M.; BEZERRA, M. A.; ARRUDA, M. A. Z.; BRUNS, R. E. & FERREIRA, S. L. C. "Determination of Cd, Cu, and Pb after cloud point extraction using multielemental sequential determination by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS)". *Sep. Sci. Technol.*, **43**(4): 815-827, 2008.
74. GONZÁLEZ, E.; AHUMADA, R.; MEDINA, V.; NEIRA, J. & GONZÁLEZ, U. "Espectrofotometría de absorción atómica con tubo en la llama: aplicación en la determinación total de cadmio, plomo y zinc en aguas frescas, agua de mar y sedimentos marinos". *Quím. Nova*, **27**(6): 873-877, 2004.
75. PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. & BUENO, M. I. M. S. "Development of a methodology for calcium, iron, potassium, magnesium manganese, and zinc quantification in teas using X-ray spectroscopy and multivariate calibration". *J. Agric. Food Chem.*, **54**(16): 5723-5730, 2006.
76. ROSINI, F.; NASCENTES, C. C.; NEIRA, J. Y. & NÓBREGA, J. A. "Evaluation of selenium behavior in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **73**(5): 845-849, 2007.
77. WU, P.; GAO, Y.; CHENG, G.; YANG, W.; LV, Y. & HOU, X. "Selective determination of trace amounts of silver in complicated matrices by displacement-cloud point extraction coupled with thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **23**(5): 752-757, 2008.
78. PETRUCELLI, G. A.; POPPI, R. J.; MINCATO, R. L. & PEREIRA-FILHO, E. R. "TS-FF-AAS and multivariate calibration: a proposition for sewage sludge slurry sample analyses". *Talanta*, **71**(2): 620-626, 2007.
79. Camacam Industrial Ltda. Certificado de análise do fabricante para as ligas metálicas.
80. BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. & BARROS NETO, B. *Planejamento e otimização de experimentos*. 2^a ed., Campinas, Editora da Unicamp, 1996.
81. GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations". *Anal. Chim. Acta*, **445**(2): 269-275, 2001.
82. BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑERO, A. & BERMEJO-BARRERA, A. "Sample pre-treatment methods for the trace elements determinations in seafood products by atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **57**(5): 969-984, 2001.

83. PRIEGO-CAPOTE, F. & LUQUE-DE-CASTRO, M. D. "Dynamic ultrasound-assisted leaching of essential macro and micronutrient metal from animal feeds prior to flame atomic absorption spectrometry". *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**(5): 1376-1381, 2004.
84. PEREIRA-FILHO, E. R. *Análise de suspensões de materiais biológicos por espectrometria de absorção atômica: novas alternativas em atomização empregando análise quimiométrica*, Campinas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2003. Tese de doutorado, 161p.
85. DONATI, G. L. *Avaliação da viabilidade da determinação de cobalto e cromo em alimentos por espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de mestrado, 99p.
86. SCHIAVO, D. *Aspectos analíticos em TS-FF-AAS: estudo de interferências e aplicação para a determinação de metais em vinhos e sucos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Dissertação de mestrado, 80p.
87. PROJETO TACO. <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>, acesso em 26/05/2008.
88. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO - NEPA. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)*, 2 ed. Campinas, Nepa-Unicamp, 2006.