

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ODIANE CUNHA BALIEIRO

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO  
SEQUENCIAL E SIMULTÂNEA DE CÁDMIO, CROMO E FERRO**

Porto Alegre, novembro de 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ODIANE CUNHA BALIEIRO

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO  
SEQUENCIAL E SIMULTÂNEA DE CÁDMIO, CROMO E FERRO**

Dissertação de mestrado apresentada  
como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Mestre em Química.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Bazzan Dessuy

Orientadora

Porto Alegre, novembro de 2023

## CIP - Catalogação na Publicação

Balieiro, Odiane Cunha

Avaliação da composição de amostras de suplementos alimentares através da determinação sequencial e simultânea de cádmio, cromo e ferro / Odiane Cunha Balieiro. -- 2024.

105 f.

Orientadora: Morgana Bazzan Dessuy.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Determinação de cádmio, cromo e ferro em suplementos alimentares. I. Dessuy, Morgana Bazzan, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A presente dissertação de mestrado foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações, as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (fevereiro/2021) e (novembro/2023), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Bazzan Dessuy. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. Rennan Geovanny  
Oliveira Araujo - UFBA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Goreti R. Vale-  
UFRGS

---

Prof. Dr. Marco Flores Ferrão -  
PPGQ/UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Bazzan  
Dessuy (Orientadora)

---

Odiane Cunha Balieiro

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

Aos meus pais, Maria Odete e Risonaldo, por todo o amor incondicional, ensinamentos, pelo suporte e por sempre estarem ao meu lado nos meus sonhos.

As minhas amadas irmãs Odilene e Odielma e sua família, pela cumplicidade, parceria, apoio a mim dedicado e por nunca largarem minha mão, aos meus sobrinhos Rayka, João e Emily que são a alegria dos meus dias, amo vocês.

Aos meus amigos e demais familiares que caminham ao meu lado em qualquer circunstância mesmo à distância, em especial ao Wander, Renê, Simone, Najara Mayla, Denilson, Dione, Dalila, David e Diego, minha eterna gratidão. Ao Naldo, que esteve sempre presente nesse processo me dando todo suporte necessário que fez toda diferença nessa jornada, por fazer parte dos meus sonhos e por me permitir fazer parte dos seus, gratidão.

À Profa. Dra. Morgana Dessuy, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação, apoio, incentivo, confiança ao longo desses anos e por toda a contribuição nesse trabalho.

Aos colegas de laboratório: Dr. Wiliam Boschetti, Dr. Leandro, Dr<sup>a</sup> Isabel e os demais integrantes do GAT pelo companheirismo, discussões, sugestões, paciência, apoio e auxílio durante o desenvolvimento desse trabalho e momentos de descontração compartilhados, em especial ao Léo pela linda amizade construída, pelas boas gargalhadas e por nunca ter soltado minha mão.

Aos professores, funcionários e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho.

## RESUMO

Nesse trabalho empregou-se a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS), com análise direta de sólidos, para a determinação sequencial e simultânea de cádmio (Cd), cromo (Cr) e ferro (Fe) em amostras de suplementos alimentares. O Cd foi determinado primeiro e, na sequência, numa segunda etapa de atomização, foram determinados Fe e Cr simultaneamente. Foram usadas as linhas principais do Cd (228,802 nm) e do Cr (357,869 nm), e a linha secundária do Fe (358,120 nm). O programa de aquecimento foi otimizado, sendo escolhida a temperatura de 700 °C para pirólise, para a atomização de Cd 1700 °C e para a atomização simultânea de Cr e Fe 2600 °C. A mistura de Pd/Mg foi usada como modificador químico. Devido as diferentes concentrações dos analitos nas amostras, foi variado o número de *pixels* usados para a avaliação do sinal analítico, assim como a introdução de fluxo de argônio na etapa de atomização. Por conta disso, três condições experimentais foram estabelecidas a fim de se obter maior faixa de trabalho. Para calibração, foram utilizadas soluções padrão aquosas multielementares. Os limites de detecção e de quantificação encontrados foram 1,9 e 6,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Cd, 4,8 e 16  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Cr e 0,7 e 2,5  $\text{mg kg}^{-1}$  para Fe, respectivamente, na condição de maior sensibilidade. A exatidão do método foi avaliada pela análise de um material de referência certificado de folha de tomateiro. Além disso, duas amostras de suplementos alimentares foram analisadas pelo método de digestão ácida (WP02 e PV01) e os resultados foram concordantes com aqueles obtidos por análise direta de sólidos. As concentrações de Cd, Cr e Fe nas amostras variaram de 33,3 a 120  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 0,28 a 17,6  $\text{mg kg}^{-1}$  e 2,99 a 138  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente. As concentrações de Cd ficaram abaixo de 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , limite máximo estabelecido pela Farmacopeia brasileira, para matéria-prima usada em suplementos alimentares. Finalmente, foi feita uma comparação dos valores encontrados para Cr e Fe com os valores informados nos rótulos das embalagens de suplementos alimentares e com os limites diários, por idade, estabelecidos pela ANVISA para garantir a conformidade com as regulamentações.

**Palavras-chave:** Análise direta de sólidos; modificador químico; metais; espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite; suplementos alimentares.

## ABSTRACT

*In this work, high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS) with direct analysis of solids was used for the sequential and simultaneous determination of cadmium (Cd), chromium (Cr) and iron (Fe) in different samples of dietary supplements. Cd was determined first and, subsequently, in a second atomization step, Fe and Cr were determined simultaneously. The main analytical lines of Cd (228.802 nm) and Cr (357.869 nm) and a secondary line of Fe (358.120 nm) were used for signal evaluation. The heating program was optimized and 700 °C was chosen as pyrolysis temperature; 1700 °C was used for Cd atomization and 2600 °C for the simultaneous atomization of Cr and Fe. The Pd/Mg mixture was used as a chemical modifier. Due to the different concentrations of the analytes in the samples, the possibility of using different pixels to evaluate the analytical signal as well as the introduction of argon flow rate during the atomization stage were explored. Consequently, three experimental conditions were established in order to obtain a greater working range. For calibration, multi-element aqueous standard solutions were used. The limits of detection and quantification found were 1.9 and 6.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for Cd, 4.8 and 16  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for Cr and 0.7 and 2.5  $\text{mg kg}^{-1}$  for Fe, respectively, using the condition of greater sensitivity. The accuracy of the method was assessed by analyzing a certified reference material of Tomato Leaves. Moreover, two dietary supplement samples were analyzed by a method involving acid digestion and the results agreed to those obtained by direct analysis. The concentrations of Cd, Cr and Fe in the samples ranged from 33.3 to 120  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 0.28 to 17.6  $\text{mg kg}^{-1}$  and 2.99 to 138  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectively. The concentrations of Cd found in the samples were below 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , that is the maximum value of Cd allowed by the Brazilian Pharmacopoeia in raw material used for dietary supplement. Finally, a comparison of Cr and Fe was made with the values reported on the labels of dietary supplement packaging and with the daily limits, by age, established by ANVISA to ensure compliance with regulations.*

**Keywords:** *Direct analysis of solids; chemical modifier; metals; high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry; dietary supplement*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Princípio da espectrometria de absorção atômica. A radiação incidente ( $P_0$ ) é absorvida pelo analito (nuvem atômica) presente na amostra atomizada, resultando em um feixe transmitido de menor intensidade ( $P$ ). (Fonte: adaptado de (Welz et al). .....27
- Figura 2.** Representação esquemática dos principais componentes de um espectrômetro de HR-CS AAS. (1) Lâmpada de arco curto de xenônio; (2) lâmpada de Neônio; (3) espelhos elipsoidais; (4) atomizador; (5) fenda de entrada do monocromador; (6) espelhos parabólicos; (8) monocromador de alta resolução é representado pela combinação de um prisma (7) e uma rede de difração *echelle* (9), (10) detector. (Welz et al.).....31
- Figura 3.** Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança das linhas analíticas de cromo e ferro, para uma solução padrão.  $T_{\text{pir Cd}}= 1700\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $T_{\text{atm Cr,Fe}}= 2600\text{ }^\circ\text{C}$ .....32
- Figura 4.** Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança das linhas analíticas de cromo e ferro da amostra IS, com 5/3  $\mu\text{g Pd/Mg}$ : (a) antes da correção por LSBC e (b) após a correção por LSBC, usando o espectro de referência da molécula  $\text{MgF}$ .  $T_{\text{pir}}= 700^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cd}}= 1700^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}}= 2600^\circ\text{C}$ .....50
- Figura 5.** Estudo da influência da massa de Pd/Mg no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para o Padrão de Referência.  $T_{\text{pir}}= 700\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{atm Cd}}= 1700\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}}= 2600\text{ }^\circ\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n= 3$ )....51
- Figura 6.** Estudo da influência da massa de Pd/Mg no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a amostra WP01. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{\text{pir}}= 700\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{atm Cd}}= 1700\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}}= 2600\text{ }^\circ\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n= 5$ ).....52
- Figura 7.** Estudo da influência da massa de Pd/Mg no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a amostra PV01. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{\text{pir}}= 700\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{atm Cd}}= 1700\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr, Fe}}= 2600\text{ }^\circ\text{C}$  e fluxo de  $0,1\text{ L min}^{-1}$  Ar durante a etapa de atomização de Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n= 5$ ).....53



<b>Figura 8.</b> Perfis de pico para massas <b>a)</b> de 20 pg Cd, <b>b)</b> de 0,2 ng Cr e <b>c)</b> de 20 ng Fe com a adição de 2,5/1,5 µg (—), 5/3 µg (—) e 7,5/4,5 µg (—) de Pd/Mg. $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	54
<b>Figura 9.</b> Perfis de pico para atomização de: <b>(a)</b> Cd, <b>(b)</b> Cr e <b>(c)</b> Fe para a amostra WP01 com adição de 2,5/1,5 µg (—), 5/3 µg (—) e 7,5/4,5 µg (—) com Pd/Mg. $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	55
<b>Figura 10.</b> Perfis de pico para atomização de: <b>(a)</b> Cd, <b>(b)</b> Cr e <b>(c)</b> Fe para a amostra PV01 com a adição de 2,5/1,5 µg (—), 5/3 µg (—) e 7,5/4,5 µg (—) com Pd/Mg. $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de 0,1 L min <sup>-1</sup> Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe.....	55
<b>Figura 11.</b> Curvas de pirólise para atomização de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a solução padrão de referência, com 5/3 µg Pd/Mg. $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 3).....	57
<b>Figura 12.</b> Curvas de pirólise para atomização de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para amostra WP01, com 5/3 µg Pd/Mg. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg. $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 5).....	57
<b>Figura 13.</b> Curvas de pirólise para Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a amostra PV01, com 5/3 µg Pd/Mg. Massa da amostra foi normalizada para 0,2 mg. $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ para e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de 0,1 L min <sup>-1</sup> Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 5).....	58
<b>Figura 14.</b> Curva de atomização para Cd (■) para a solução padrão de referência, com 5/3 µg Pd/Mg. $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 3).....	60
<b>Figura 15.</b> Curva de atomização para Cd (■) para a amostra WP01, com 5/3 µg Pd/Mg. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg. $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ para Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 5).....	61
<b>Figura 16.</b> Curva de atomização para Cd (■) para a amostra PV01, com 5/3 µg Pd/Mg. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg. $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de 0,1 L min <sup>-1</sup> Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe.	

As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 5).....	61
<b>Figura 17.</b> Curva de atomização para Cr (●) e Fe (▲) para a solução padrão de referência, com 5/3 µg Pd/Mg. $T_{pir}= 700\text{ °C}$ e $T_{atm}= 1700\text{ °C}$ para Cd. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 3).....	63
<b>Figura 18.</b> Curva de atomização para Cr (●) e Fe (▲) para a amostra WP01, com 5/3 µg Pd/Mg). Massa da amostra normalizada para 0,2 mg. $T_{pir}= 700\text{ °C}$ e $T_{atm\ Cd}= 1700\text{ °C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 5).....	64
<b>Figura 19.</b> Curva de atomização para Cr (●) e Fe (▲) para a amostra PV01, com 5/3 µg Pd/Mg. Massa normalizada para 0,2 mg. $T_{pir}= 700\text{ °C}$ e $T_{atm\ Cd}= 1700\text{ °C}$ e fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 5).....	64
<b>Figura 20.</b> Influência da massa de amostra para WP01 no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲), com 5/3 µg Pd/Mg. $T_{pir}= 700\text{ °C}$ , $T_{atm\ Cd}= 1700\text{ °C}$ e $T_{atm\ Cr,Fe}= 2600\text{ °C}$ .....	65
<b>Figura 21.</b> Influência da massa de amostra para PV01 no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲), com 5/3 µg Pd/Mg. $T_{pir}= 700\text{ °C}$ , $T_{atm\ Cd}= 1700\text{ °C}$ e $T_{atm\ Cr,Fe}= 2600\text{ °C}$ e fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe.....	67
<b>Figura 22.</b> Comparação das concentrações de a) Cd, b) Cr e c) Fe, obtidas por análise direta por HR-CS-GF AAS (barras azuis) e LS-GF AAS, após MW-AD (barras vermelhas). Resultados expressos com média ± intervalo de confiança (n= 5) .....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de limites <i>mínimos e máximos</i> de Cr e Fe, que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo, por grupo populacional indicado pelo fabricante segundo a ANVISA.....	11
<b>Tabela 2.</b> Trabalhos que relatam a determinação de metais e metaloides em suplementos alimentares usando técnicas de espectrometria atômica.....	13
<b>Tabela 3.</b> Programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação simultânea e sequencial de Cd, Cr e Fe <i>via</i> HR-CS GF AAS utilizando a análise direta de amostras sólidas.....	37
<b>Tabela 4.</b> Condições instrumentais utilizadas durante a etapa de atomização e avaliação do sinal de Cd, Cr e Fe.....	38
<b>Tabela 5.</b> Tipos de amostras de suplementos alimentares avaliadas, códigos, faixa etária recomendada, formas de comercialização e recomendação de consumo diário pelo fabricante.....	40
<b>Tabela 6.</b> Programa de aquecimento para digestão das amostras de suplemento alimentares assistida por radiação micro-ondas.....	42
<b>Tabela 7.</b> Condições operacionais aplicadas nos métodos analíticos para a determinação de Cd, Cr e Fe.....	43
<b>Tabela 8.</b> Programa de aquecimento aplicado nos métodos analíticos para a determinação de Cd, Cr e Fe por LS-GF AAS.....	44
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros de mérito obtidos para Cd, Cr e Fe utilizando diferentes condições experimentais <i>via</i> HR-CS GF AAS e a análise direta de amostras sólidas.....	68
<b>Tabela 10.</b> Concentrações de Cd, Fe e Cr no SRM de folha de tomate (NIST 1573a, <i>Tomate Leaves</i> ) por HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos. Resultado expresso como média $\pm$ desvio padrão (n=4).....	72
<b>Tabela 11.</b> Concentrações de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares quantificadas por HR-CS GF AAS (n = 5).....	75
<b>Tabela 12.</b> Valores calculados de Cr e Fe por dose diária recomendada pelo fabricante e valores informados no rótulo dos suplementos analisados.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS - Espectrometria de absorção atômica (do inglês: *Atomic absorption spectrometry*)

ABIAD - Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres

A<sub>int</sub> - Absorvância integrada

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD - Dispositivo de carga acoplada (do inglês: *charge-coupled device*)

CP - Pixel central (do inglês: *center pixel*)

CRM - Material de referência certificado (do inglês: *certified reference material*)

CV-AFS - Espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (do inglês: *cold vapor atomic fluorescence spectrometry*)

ET AAS - Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (do inglês: *electrothermal Atomic absorption spectrometry*)

F AAS - Espectrometria de absorção atômica em chama (do inglês: *flame Atomic absorption spectrometry*)

FDA - Food and Drugs Administration

GF AAS - Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (do inglês: *graphite Furnace Atomic absorption spectrometry*)

HR-CS AAS- Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (do inglês: *high-resolution continuum source Atomic absorption spectrometry*)

IARC - Agência internacional de pesquisa em câncer

ICP - Plasma indutivamente acoplado (do inglês: *inductively coupled plasma*)

IN – Instrução Normativa

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LA – Ablação a laser (do inglês: *laser ablation*)

LOD - Limite de detecção (do inglês: *limit of detection*)

LOQ - Limite de quantificação (do inglês: *limit of quantification*)

LS AAS – Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês: *line source*)

LSBC - Correção de fundo por mínimos quadrados (*do inglês: least-square background correction*)

$m_0$  - massa característica

MS - Espectrometria de massa (*do inglês: mass spectrometry*)

NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

OES - Espectrometria de emissão óptica (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)

P - Radiação transmitida

$P_0$  - Radiação incidente

R - Coeficiente de correlação

RDA - Ingestão diária recomendada

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RSD - Desvio padrão relativo (*do inglês: relative standard deviation*)

S/N – Razão sinal/ruído (*do inglês: signal-to-noise ratio*)

SD – Desvio padrão (*do inglês: standard deviation*)

SRM – Material de Referência Padrão (*do inglês: standard reference material*)

SS – Análise direta de sólidos (*do inglês: solid sampling*)

STPF - Forno-Plataforma de Temperatura Estabilizada (*do inglês: Stabilized Temperature Platform Furnace*)

T – Transmitância

$T_{atm}$  - Temperatura de atomização

$T_{pir}$  - Temperatura de pirólise

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Geral .....	3
2.2 Específicos .....	3
3. Revisão bibliográfica.....	4
3.1 Suplementos alimentares.....	4
3.2 Regulamentação dos suplementos.....	5
3.3 Cádmio, cromo e ferro.....	8
3.4 Técnicas para determinação elementar em suplementos alimentares.....	12
3.5 Espectrometria de absorção atômica e a análise direta de sólidos.....	26
3.6 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua .....	30
4. Parte experimental.....	36
4.1 Instrumentação e condições experimentais.....	36
4.2 Reagentes.....	38
4.3 Amostras e material de referência certificado.....	39
4.4 Modificadores químicos.....	41
4.5 Procedimento analítico.....	41
4.6 Comparação com método de referência.....	42
4.6.1 Instrumentação de LS-GF AAS e condições experimentais para amostras digeridas.....	43
4.7 Parâmetros de mérito.....	45
4.7.1 Avaliação da exatidão.....	45
4.7.2 Avaliação da precisão.....	45
4.7.3 Limites de detecção e quantificação.....	45
4.7.4 Massa característica.....	46
5. Resultados e discussão.....	47
5.1 Estudos prévios.....	47
5.2 Avaliação do uso de modificador químico.....	47

5.3 Estudo da influência da massa do modificador químico.....	50
5.4 Curvas de pirólise e atomização .....	56
5.5 Estudo da influência da massa de amostra.....	65
5.6 Parâmetros de mérito.....	67
5.6.1 Exatidão.. .....	71
5.6.2 Aplicação do método e análise de rotulagem.....	74
5.6.2.1 Precisão.....	76
5.6.2.2 Comparação das concentrações de Cd, Cr e Fe com a legislação.....	77
6. Conclusão .....	80
Referências.....	81

## 1. Introdução

De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os suplementos alimentares são produtos para ingestão oral, apresentados em formas farmacêuticas, destinados a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados.

O consumo de suplementos alimentares aumentou consideravelmente nos últimos anos e a pandemia de coronavírus impulsionou ainda mais esse consumo, como mostra um levantamento encomendado pela Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para fins Especiais e Congêneres (ABIAD), sendo que, houve um aumento de 48% no consumo de suplementos. A maior procura foi por multivitamínicos (28%), vitaminas C (26%) e vitaminas D (8%), apesar de não haver comprovação científica de que suplementos reduzam o risco de contágio pelo coronavírus.

Devido ao fácil acesso, os suplementos alimentares, normalmente, são consumidos sem recomendações de profissionais especializado. Paralelamente, muitos consumidores têm informações limitadas sobre este produto e logo não são capazes de avaliar os benefícios e os possíveis riscos à saúde oferecidos pelo seu consumo.

A comercialização sem controle de registro na ANVISA ou contendo constituintes não aprovados pela agência, levou o Brasil a implementar regulamentações mais rigorosas para suplementos alimentares em 2018, por meio da RDC nº 243/2018 e subsequentes instruções normativas: a Instrução Normativa (IN) nº 284/2018, que foi atualizada posteriormente para IN nº 102, de 15 de outubro de 2021. Essas regulamentações estabelecem a lista de constituintes permitidos, limites de uso, alegações de saúde e requisitos de rotulagem para os suplementos alimentares.



Por conta das, relativamente novas regulamentações da ANVISA e do elevado consumo de suplementos alimentares, surge a necessidade de métodos analíticos confiáveis para avaliar a conformidade dessas substâncias com os limites estabelecidos pelas normas, e investigar a presença de possíveis contaminantes inorgânicos. Para isso, a análise direta de amostras sólidas empregando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS) é uma abordagem atrativa. A combinação da HR-CS GF AAS com a análise direta de sólidos minimiza o tempo de análise química, pois as amostras requerem um mínimo tratamento prévio, além de permitir a determinação sequencial e/ou simultânea de elementos químicos em diferentes tipos de matrizes. Isso significa que é possível realizar a determinação multielementar a partir de uma única alíquota da amostra. Isso economiza tempo e recursos, tornando-a atrativa e adequada para a análise química de amostras de suplementos alimentares que podem conter uma variedade de constituintes inorgânicos.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Desenvolver um método analítico para determinação sequencial e simultânea de cádmio, cromo e ferro em amostras de suplementos alimentares, por HR-CS GF AAS empregando a análise direta de amostras.

### **2.2 Específicos**

1. Investigar o uso de  $H_2SO_4$  e a mistura de  $Pd(NO_3)_2$  e  $Mg(NO_3)_2$  como modificadores químicos e determinar as quantidades ótimas à análise química;
2. Otimizar o programa de aquecimento do forno de grafite, através da construção de curvas de pirólise a atomização, e estabelecer as temperaturas ótimas de pirólise e de atomização para os três analitos;
3. Avaliar a influência da massa das amostras introduzidas no forno nos sinais analíticos e definir a quantidade ideal de amostras para as análises;
4. Estabelecer os parâmetros de mérito limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), massa característica ( $m_0$ ), precisão e exatidão;
5. Quantificar Cd, Cr e Fe nas amostras de suplementos alimentares utilizando o método analítico desenvolvido e comparar os resultados obtidos com os limites estabelecidos pela ANVISA e com os rótulos das amostras.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1 Suplementos alimentares

Conforme as diretrizes da ANVISA, os suplementos alimentares englobam produtos destinados a suplementar a alimentação por via oral, apresentados em formas farmacêuticas. Seu propósito é fornecer nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, de maneira isolada ou combinada, a indivíduos saudáveis. Esses suplementos são disponibilizados em diversas apresentações, como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas, saquetas de pó e ampolas líquidas<sup>1-2</sup>.

O consumo de suplementos alimentares tem aumentado, impulsionado por uma ampla gama de motivações. Muitos indivíduos recorrem a esses produtos, com o propósito de suplementar os elementos essenciais para o organismo, visando aprimorar a saúde e bem-estar a longo prazo, suposto ser de origem natural, seguro, sem efeitos adversos. Além disso, a busca afim de amenizar os riscos relacionados ao envelhecimento também é um fator considerável<sup>3</sup>.

Diversas questões contribuem para a disseminação do uso de suplementos. A fácil acessibilidade desses produtos, aliada à influência do *marketing*, juntamente com o estilo de vida agitado e frenético característico da sociedade contemporânea, desempenham um papel de destaque. Diante da necessidade de alternativas práticas e rápidas para promover a saúde, muitas pessoas veem nos suplementos alimentares uma opção conveniente. Como resultado, tem-se observado um crescimento exponencial na adoção de produtos botânicos, minerais e vitaminas nos últimos anos<sup>3</sup>.

A demanda crescente por suplementos nos últimos anos foi respaldada por um relatório recente da Zion Market Research, publicado em 2019, que projetou um aumento significativo no consumo, entre 2015 e 2021, com estimativa de receita global na ordem de US\$ 220,3 bilhões no mercado de suplementos. Esse crescimento foi ainda mais evidente durante o período da pandemia da COVID-19, quando a busca por produtos que auxiliassem na imunidade e prevenção da doença impulsionou ainda mais essa previsão<sup>2</sup>.

Uma pesquisa realizada no primeiro trimestre de 2020 pela Agência Brasileira da Indústria de Alimentos para fins Especiais e Congêneres (ABIAD), em sete capitais distribuídas pelas cinco regiões do Brasil, concluiu que 59% dos lares brasileiros possuíam pelo menos um indivíduo consumindo suplementos, sendo que, 76% das compras desses produtos ocorriam em farmácias<sup>4</sup>.

O mercado de suplementos alimentares é vasto e diversificado, oferecendo uma ampla variedade de produtos originados de diferentes fontes. Além dos suplementos sintéticos, produzidos em laboratórios a partir de matérias-primas com composição conhecida e frequentemente certificada, há também aqueles derivados de fontes naturais, como extratos de plantas, ervas, fungos, algas, líquenes, peixes e outros ingredientes naturais. A diversidade de origens dos suplementos alimentares é um dos pilares do crescimento exponencial desse mercado, atendendo a uma diversidade de consumidores em busca de maneiras diversas de complementar a dieta<sup>2</sup>.

### **3.2 Regulamentação dos suplementos**

Apesar dos suplementos alimentares, em geral, serem considerados benéficos para a saúde e não causarem reações adversas, diversos estudos<sup>5-6-7-8-9</sup> têm indicado a presença de elementos potencialmente tóxicos e outros componentes prejudiciais à saúde nesses produtos. A incorporação de metais e metaloides nos suplementos pode ser de origem tanto de contaminação do solo, proveniente de atividades industriais, ou da contaminação ambiental, seja natural ou causada pelo ser humano. Essa contaminação pode ser influenciada por fatores geoquímicos do solo, além de ocorrer durante os processos de fabricação e armazenamento inadequado dos suplementos<sup>3</sup>.

Dentre as principais regulamentações mundiais, do ponto de vista regulatório, a lei, de acordo com a Administração de Alimentos e Drogas do Estados Unidos da América (*Food and Drug Administration – FDA*), define suplementos alimentares como produtos que se destinam a complementar a dieta e contêm um ou mais “ingredientes dietéticos”. Estes ingredientes dietéticos podem incluir, mas não estão limitados a vitaminas, minerais, ervas ou outros vegetais, aminoácidos ou outras substâncias

dietéticas, que complementam a dieta, por exemplo, aumentando a ingestão alimentar total, ou concentrados<sup>2</sup>.

No entanto, até agora, não existe consistência no estatuto jurídico dos suplementos alimentares, por exemplo, a União Europeia (UE). Portanto, para harmonizar o estatuto regulamentar dos suplementos alimentares nos diferentes países da UE, foi criado um quadro jurídico e regulamentar para estes produtos dietéticos com a Diretiva 2002/46/CE dos Suplementos Alimentares<sup>2</sup>.

A agência reguladora ligada ao departamento de saúde do governo norte-americano, através da *Food and Drugs Administration* (FDA), estabelece que os suplementos alimentares devem conter apenas o que está declarado no rótulo e nenhum outro conteúdo indesejável ou nocivo à saúde<sup>3</sup>.

No Brasil, somente em 2018 a ANVISA estabeleceu regulamentações a respeito dos suplementos alimentares, a Instrução Normativa (IN) nº 28, de 26 de julho de 2018, como objetivo de colocar na categoria de suplementos alimentares produtos que estavam enquadrados em seis categorias de alimentos e na categoria de medicamento. A Instrução Normativa nº 28 de 26 de julho de 2018, define a lista de limites mínimos de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo, representado no anexo III da normativa. Assim também como foi estipulado no anexo IV a definição dos limites máximos de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos que não podem ser ultrapassados pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo e por grupo populacional indicado pelo fabricante. Esses limites mínimos e máximos foram divididos por grupo populacional, variando de acordo com as faixas etárias (0 a 6 meses, 7 a 11 meses, 1 a 3 anos, 4 a 8 anos, 9 a 18 anos, ≥ 19 anos), incluindo também categorias para gestantes e lactantes<sup>10</sup>. A IN/ANVISA nº 28, de 26 de julho de 2018 foi alterada pela Instrução Normativa N° 102, de 15 de outubro de 2021<sup>11</sup> tendo como alteração somente a inclusão da presença do silício na lista com seu limite máximo.

A Resolução RDC nº 243/2018 é uma regulamentação emitida pela ANVISA, que estabelece as normas e requisitos para a fabricação, comercialização e rotulagem

de suplementos alimentares no país. Essa resolução é um marco regulatório importante para a indústria de suplementos alimentares, visando garantir a segurança e a qualidade desses produtos para os consumidores. Uma das principais áreas abordadas pela Resolução RDC nº 243/2018 é a da pureza dos ingredientes utilizados na fabricação de suplementos alimentares. Ela estabelece critérios e requisitos para a seleção e utilização de ingredientes, com o objetivo de garantir que esses ingredientes estejam livres de contaminação por substâncias indesejadas, como metais pesados.

Para concentração do Cd, que é um metal potencialmente tóxico, devem ser considerados os limites estabelecidos para cada constituinte nas especificações das referências que são reconhecidas no Art. 8º da RDC nº 243/2018. A Farmacopeia Brasileira está presente nessas referências e estabelece limites diferenciados para cada elemento químico, de acordo com a sua toxicidade, forma farmacêutica e via de administração, sendo, o limite máximo estabelecido para administração, via oral, para concentração de Cd é de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  <sup>12</sup>.

### 3.3 Cádmio, cromo e ferro

O acesso às informações quanto a composição química dos suplementos alimentares é necessária. Os metais potencialmente tóxicos representam um risco ambiental significativo, pois não são biodegradáveis e persistem na atmosfera por muito tempo, entre eles está o cádmio<sup>13</sup>. Este metal é usado principalmente como anticorrosivo em aço galvanizado; o sulfeto de cádmio como pigmentos em plásticos e os compostos de cádmio na manufatura de pilhas e baterias recarregáveis de níquel-cádmio, em componentes eletrônicos e reatores nucleares<sup>13-14</sup>.

A principal fonte de exposição ao Cd para a população tem sido através dos alimentos. Outra fonte do contato com desse metal traço é através do fumo, já que as folhas de tabaco acumulam naturalmente altas quantidades do metal. Estima-se que fumantes estão expostos a 1,7 µg de cádmio por cigarro e cerca de 10% é inalado quando se fuma<sup>13</sup>.

A concentração de Cd contida no solo e na água pode ser absorvido por certas culturas e organismos aquáticos e se acumular na cadeia alimentar. Elevados níveis de Cd foram encontrados em formulações de algas, produtos à base de cacau, crustáceos, fungos, oleaginosas, algas marinhas e moluscos aquáticos<sup>13</sup>.

Nos vegetais, cereais e raízes amiláceas concentrações mais baixas de Cd são encontradas. No entanto, quando o consumo é levado em conta, as categorias de alimentos que mais contribuem para a exposição ao Cd em vários países são cereais/grãos, vegetais, carnes, órgãos de aves e frutos do mar (especialmente moluscos)<sup>13</sup>.

A ingestão prolongada de elevadas doses de Cd pode causar sérios danos à de saúde, pois é facilmente acumulado na cadeia alimentar. O consumo excessivo de alimentos contaminados com Cd causa sérios problemas a órgãos importantes, incluindo pulmões e fígado, e também leva ao câncer e outras doenças fatais à saúde. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica o cádmio e seus compostos como cancerígenos para o ser humano (Grupo 1), com base em evidência de tumores pulmonares em trabalhadores e animais expostos por via inalatória<sup>13-15</sup>.

Apesar das evidências da presença de Cd em suplementos alimentares, haja visto que os produtos naturais são uma das fontes de produção dos suplementos, a ANVISA não dispõe, até então, nenhuma legislação para o controle de limites permitidos da concentração de Cd em suplementos alimentares, somente com relação aos ingredientes, conforme a RDC nº 243/2018.

O cromo é um nutriente essencial para o ser humano proveniente de fontes antropogênicas. Dada a sua importância no metabolismo da glicose e dos lipídios e na manutenção da integridade estrutural do ácido nucléico (NA), foi designado como um elemento químico farmacologicamente ativo<sup>16</sup>.

A ingestão de Cr se dá através da alimentação ou produtos fabricados com o metal; é reconhecido como elemento essencial para a saúde humana, quando na forma química Cr(III), desde que seja consumido em pequenas quantidades. Por isso, é comum ser encontrado em uma variedade de suplementos dietéticos, além de sua presença em dietas diárias de cereais integrais e queijo. Porém, seu consumo descontrolado pode levar à intoxicação por cromo, a qual é caracterizada por alterações anatomopatológicas nos pulmões, rins e fígado. Além disso, estudos evidenciam que a exposição crônica a Cr pode causar o surgimento de células cancerosas, principalmente nos pulmões<sup>15-16</sup>.

O ferro é um micronutriente essencial para a vida e atua principalmente na síntese de células vermelhas do sangue (hemácias) e no transporte do oxigênio no organismo e função imunológica<sup>17</sup>. Este metal é obtido principalmente através dos alimentos; as principais fontes dietéticas de ferro são tanto alimentos de origem animal quanto vegetal como carne, peixes, frutos do mar, legumes, grãos fortificados e espinafre<sup>18</sup>. Além do Fe estar naturalmente presente em alimentos, muitos produtos industrializados são fortificados com este metal afim de combater a anemia ferropriva proveniente da carência desse elemento químico. Um dos meios de ingestão para compensar essa carência é através do consumo de suplementos alimentares.

A deficiência de Fe pode prejudicar a função imunológica e os sistemas metabólicos, além de provocar a anemia, já citada acima. A falta de ferro pode causar cansaço incomum, falta de ar, diminuição do desempenho físico e problemas de



aprendizagem em crianças e adultos, bem como aumentar o risco de infecções<sup>19-20</sup>. Enquanto o excesso de ferro pode se depositar nos tecidos e prejudicar a função do corpo por catalisar a oxidação<sup>18</sup>.

A ingestão dietética recomendada (RDA) de Fe é de 8 e 18 mg dia<sup>-1</sup> para homens e mulheres, respectivamente, e o limite de ingestão superior tolerável (UL) é de 45 mg dia<sup>21</sup>. Logo, é importante estar ciente de que o excesso de nutrientes também pode representar uma ameaça à saúde. Assim, cuidado especial deve ser dado aos nutrientes que estão sendo suplementados, pois qualquer nutriente acima de seu nível de toxicidade pode ser muito perigoso<sup>2</sup>.

Considerando o risco de intoxicação, caso consumido em excesso e sem controle, é necessário o monitoramento das concentrações de minerais em suplementos alimentares. Por isso, a legislação de suplementos alimentares publicada pela ANVISA (IN nº 102/2021)<sup>11</sup> apresenta os limites mínimos e máximos diários dos minerais, definidos por grupo populacional de acordo com a faixa etária. A Tabela 1 apresenta os valores de limites mínimos e máximos para Fe e Cr.

**Tabela 1.** Lista de limites *mínimos e máximos* de Cr e Fe, que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo, por grupo populacional indicado pelo fabricante segundo a ANVISA.

<b>Nutrientes</b>	<b>0 a 6 meses</b>	<b>7 a 11 meses</b>	<b>1 a 3 anos</b>	<b>4 a 8 anos</b>	<b>9 a 18 anos</b>	<b>≥ 19 anos</b>	<b>Gestantes</b>	<b>Lactantes</b>
<b>Ferro (mg)</b>	0,04–39,73	1,65–29	1,05–33	1,5–30	2,25–29	2,7–34,31	4,05–34,71	1,5–34,96
<b>Cromo (µg)</b>	0,03–0,3	0,825–8,25	1,65–16,5	2,25–22,5	5,25–52,5	5,25–250	4,5–45	6,75–67,5

### **3.4 Técnicas para determinação elementar em suplementos alimentares**

Apesar da regulamentação da Instrução normativa (IN nº 102/2021), a ANVISA ainda não recomenda um método analítico oficial para determinação elementar em suplementos alimentares. Neste contexto, técnicas analíticas têm sido propostas nos últimos anos afim de investigar a composição elementar e discutir brevemente se as concentrações dos constituintes inorgânicos declarados nos rótulos estão de acordo com os níveis encontrados<sup>3</sup>.

Para isso há diferentes técnicas de espectrometria atômica utilizadas na determinação de metais e metaloides em suplementos alimentares como: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS), Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com chama (HR-CS F AAS) e a Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR-CS GF AAS). Essas técnicas são as mais difundidas para esse tipo de amostra, além das Espectrometria de fluorescência atômica (AFS) e Fluorescência de raios-X (XRF)<sup>3-43</sup>. Na Tabela 2 estão listados alguns trabalhos que utilizaram a espectrometria atômica na análise de suplementos alimentares.

**Tabela 2.** Trabalhos que relatam a determinação de metais e metaloides em suplementos alimentares usando técnicas de espectrometria atômica. (Continua)

<b>Analito</b>	<b>Amostra</b>	<b>Técnica</b>	<b>Método de preparo</b>	<b>Referências</b>
As, Bi, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, V e Zn	Suplementos alimentares	ICP OES	Foi feita a digestão, em micro-ondas, cerca de 0,5 g de cada amostra, com 7 mL de HNO <sub>3</sub> e 3 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Após, as amostras digeridas foram evaporadas lentamente até quase a secura e então dissolvidas e avolumadas com água ultrapura para leitura por ICP OES. Para a exatidão, dois materiais de referência certificados (TORT-1 - hepatopâncreas de lagosta e MURST ISS-A2 - krill antártico) foram submetidas ao mesmo tratamento que as amostras e incluídos no processo analítico geral. Todas as amostras analisadas apresentaram As, Cd e Pb. Os elementos mais abundantes, detectados em porcentagem, foram Ca, Mg e Fe.	22
As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sn, V e Zn	Suplementos alimentares	ICP-MS ou ICP OES	Massas em torno de 1,0 g das amostras foram digeridas com 5 mL de HNO <sub>3</sub> seguido de 2 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% m m <sup>-1</sup> . Os elementos As, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mo, Na, P, Sn, e Zn foram determinados por ICP OES. Os elementos Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e V foram determinados por ICP-MS usando a digestão de 0,25 g de amostra. Para avaliar a exatidão do método foram utilizados materiais de referência certificado de folhas, que foram preparados da mesma forma que as amostras. Foi usada método de calibração externa.	23

Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn, P e S	Suplementos esportivos	ICP OES	<p>Massa de 1350 mg das amostras foi digerida em forno de micro-ondas utilizando 6 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 5 mol <math>\text{L}^{-1}</math> sob pressão de 5 bar de oxigênio, durante 15 min. O método se mostrou viável e adequado na preparação de amostras de suplementos esportivos para posterior determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn, P e S por ICP OES. Para comparação foi realizada a decomposição por digestão convencional assistida por micro-ondas (MW-AD), utilizando de <math>\text{HNO}_3</math> concentrado, aplicando o mesmo programa de irradiação de micro-ondas utilizado anteriormente, e determinados por ICP-OES, os resultados obtidos estavam concordantes estatisticamente. A exatidão do método foi avaliada através de testes de recuperação utilizando uma solução padrão e da análise de um material de referência certificado, obtendo valores entre 86 e 108 % em ambas as avaliações para todos os analitos. Após análises dos suplementos esportivos, a maioria dos analitos estavam em desacordo com o informado no rótulo.</p>	24
As e Cd	Suplementos de multivitaminicos (MVM)	ICP-MS	<p>O procedimento de co-precipitação sequencial de três etapas para remover efetivamente as interferências da matriz salina das soluções de MVM, para garantir uma determinação confiável de As e Cd por ICP-MS. KCl, Mo e Sn são reduzidos através de co-precipitações com <math>\text{Mg}(\text{OH})_2</math> em duas etapas. Isso ajuda a eliminar a matriz salina interferente das soluções de MVM, que pode afetar a determinação de As e Cd. Uma terceira etapa de co-precipitação com a mistura HF + <math>\text{NH}_4\text{OH}</math> foi realizada para precipitar todo o Ca e Mg da solução MVM e</p>	25

---

			<p>manter As e Cd em solução. Isso elimina esses elementos predominantes da matriz. Massa de 0,150 g das amostras foram pesadas e digeridas com 4 mL de HNO<sub>3</sub> e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As digestões foram diluídas para 2 mL e tratadas inteiramente com o procedimento de coprecipitação e quantificadas. O método demonstrou recuperações de cerca de 96% e 95% para As e Cd, respectivamente. Além disso, o método foi validado utilizando material de referência certificado de comprimidos multivitamínicos/multielementares (SRM3280). A análise de MVM indicou menores impurezas de As e Cd em comparação com as relatadas anteriormente na literatura.</p>	
As, Cr, Cu, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pt, Rh e Ru	Produtos farmacêuticos e suplementos alimentares	WDXRF	Foram realizadas medidas por Espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) de amostras reais de medicamentos e suplementos alimentares usando padrões sintéticos para calibração. Esses padrões foram preparados através da dopagem de pó de celulose com quantidades conhecidas dos analitos. A exatidão foi determinada através de testes de recuperação, sendo obtidos valores entre 70-150%.	26
Cr, Mn, Mo, Os, Pb e Ru	Formulações orais sólidas de suplementos alimentares	WDXRF	Amostras sólidas foram reduzidas a pó e homogeneizadas com almofariz de vidro e pilão. Quando necessário, o revestimento gelatinoso das pílulas foi removido mecanicamente abrindo as cápsulas, e o conteúdo de pó interior foi analisado por WDXRF. Para a preparação dos padrões de calibração foi utilizado pó de celulose enriquecido com quantidades conhecidas de cada elemento em estudo. Em um suplemento alimentar analisado foi	27

---

			detectada a presença de Pb e Mn em altas concentrações e em outros dois as concentrações de cromo estavam acima da dose diária de referência.	
Arsênio total e inorgânico	Suplementos alimentares	HG AAS	Para a determinação do As total as amostras foram reduzidas à cinzas, as quais foram dissolvidas com HCl 6 mol L <sup>-1</sup> , tratadas com uma mistura de KI e ác. Ascórbico e analisadas por HG AAS. Para determinação do As inorgânico as amostras foram deixadas em com HCl 9 mol L <sup>-1</sup> <i>overnight</i> e, posteriormente, o As foi reduzido com HBr e hidrazina e extraído com clorofórmio e posteriormente extraído em HCl 1 mol L <sup>-1</sup> . Esse extrato foi reduzido a cinzas e quantificado pelo mesmo procedimento descrito acima para As total. A exatidão foi avaliada com o material de referência de Farinha de Arroz (SRM 1568a) com recuperação de 97,6% para Arsênio total. Para o Arsênio inorgânico não existem materiais de referência, então, os valores médios foram determinados com o mesmo SRM e comparado com outro trabalho. Concentrações de Arsênio total foram encontradas em todas as amostras. Já o Arsênio inorgânico, foi detectado apenas em duas amostras.	28
Hg	Suplementos alimentares	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de	As amostras foram mineralizadas em forno de micro-ondas, de acordo com o método US EPA 3051, usando cerca de 1 g de amostra e 9 mL de HCl e 3 mL de HNO <sub>3</sub> e analisadas por CV-AFS. O método foi validado utilizando Folhas de Maçã (SRM 1515), aplicando o mesmo procedimento utilizado no estudo, indicando recuperação de 97,7%. Nos suplementos alimentares analisados as concentrações variaram de 0,9 –16,7 ng g <sup>-1</sup> .	29

		vapor frio (CV-AFS)		
Cd <sup>2+</sup>	Suplemento dietético ômega-3	Empregando Espectrometria de absorção atômica em forno de chama termospray (TS-FF-AAS)	A extração de Cd <sup>2+</sup> de suplementos dietéticos de ômega-3 (óleo de peixe) foi realizada pelo procedimento extração induzida por quebra de emulsão (EIEB). O método baseou-se na formação de uma emulsão água-em-óleo pela adição de solução extratora constituída por 3,54% (m/v) Triton X-114 e 1,16 mol L <sup>-1</sup> de HNO <sub>3</sub> à amostra de óleo e posterior quebra da emulsão por aquecimento. Duas fases bem definidas foram formadas e a fase aquosa, contendo os íons de cádmio extraídos, foi analisada por TS-FF-AAS usando um sistema de injeção em fluxo. A validação do método foi garantida pela boa concordância com os resultados obtidos pelo procedimento de digestão ácida assistida por micro-ondas sem diferenças estatísticas (intervalo de confiança de 95%) e pela adição de concentrações conhecidas de 50 ng g <sup>-1</sup> Cd <sup>2+</sup> nas amostras. Foi realizada a calibração externa. O teor de Cd <sup>2+</sup> nas amostras variou de 37,3 a 54,5 ng g <sup>-1</sup> .	30
Cd, Pb e Hg	Suplementos dietéticos a partir de plantas medicinais, plantas terrestres ou microalgas	FAAS e CV-AAS	A determinação do teor de Cd e Pb foi baseada na mineralização a seco das amostras. As amostras foram homogeneizadas e então foram carbonizadas e depois calcinadas em mufla a uma temperatura não superior a 450°C. A cinza resultante foi dissolvida em HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> e, em seguida, a extração de chumbo e cádmio com metil isobutil cetona foi realizada após a complexação dos metais com o complexo 1-pirrolidinoditiocarbamato de amônio (APDC). O teor	31



---

			de metais foi determinado por FAAS utilizando comprimento de onda de 283,3 nm para Pb e 228,8 nm para Cd. O método de determinação de Hg consistiu na mineralização úmida das amostras em uma mistura de ácidos na presença de um catalisador e determinação por CV-AAS. 68,3% das amostras estavam contaminadas com Cd e Pb e o mercúrio em 29%.	
Zn	Suplementos dietéticos populares	FAAS	Cerca de 0,3 g das amostras foram trituradas e homogeneizadas e submetidas à mineralização por micro-ondas usando HNO <sub>3</sub> 65% e determinado por FAAS. Para validação do método foi usado o material de referência <i>Mixed Polish Herbs</i> . Os resultados apontaram que o teor de zinco de todos os produtos testados foi inferior ao declarado. As diferenças foram em média de 10%.	32

---

Cu, Zn, Mn, Mg e Si	Bebidas, infusões de ervas e suplementos alimentares	HR-CS FAAS	A introdução da amostra foi realizada usando um sistema de injeção de fluxo e foi utilizado as asas dos picos. As amostras de suplementos alimentares foram obtidas a partir de um extrato concentrado de ervas. Foram diluídas com volumes adequados de tampão La, HNO <sub>3</sub> e água ultrapura para perfazer até 25,0 mL em HNO <sub>3</sub> 0,6% e 10 g L <sup>-1</sup> La. Para a análise, essas amostras foram diluídas utilizando uma alíquota de 10 mL de cada amostra. A determinação sequencial dos cinco elementos foi realizada, utilizando menos de 3,5 mL de amostra para realizar a análise completa. A determinação foi realizada em duas corridas, alterando a composição da chama. Os cinco elementos podem ser determinados usando uma solução de amostra única. Para validar o método proposto, amostras foram enriquecidas, em triplicata, com os analitos em diferentes concentrações e foram calculadas recuperações. Foram obtidos valores entre 95 a 115% dos 5 elementos analisados. A calibração foi realizada com padrões aquoso.	33
Pb, As, Cd, Fe, Ni, Cu, Co, Cr e Mn	Suplementos alimentares à base de cogumelos comestíveis	GF AAS	Preparações comerciais dos cogumelos <i>Coprinus comatus</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> e <i>Ganoderma lucidum</i> foram utilizadas para o experimento. Essas preparações podem ser encontradas nas farmácias sérvias como suplementos alimentares e representam 100% de pó seco de cogumelo. 7 g das amostras de cogumelos foram extraídas usando um extrator Soxhlet, por 5 horas, com metanol e depois filtrado. Os extratos metanólicos foram evaporados até a secura sob pressão reduzida. O método de extração foi comparado com uma digestão ácida em micro-ondas usando 7 mL de HNO <sub>3</sub> (69%) e 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%). Não foi relatado pelos autores o uso de modificador químico no	34

			trabalho. Foi realizada a calibração externa com padrões aquosos. A validação do método foi realizada pela recuperação dos elementos de amostras de cogumelos secos, obtendo valores entre 60 a 132%. Foram encontradas concentrações dos elementos nas amostras analisadas.	
Íons de cobalto	Suplementos vitamínicos	Microextração dispersiva líquido-líquido assistida por ultrassom, sem ligantes com líquido iônico de tarefa específica (TSIL-USA-DLLME) e ET AAS.	A TSIL-USA-DLLME foi usada para pré-concentração de íons de cobalto em amostras de alimentos e água e em suplementos vitamínicos antes da análise. O método é livre de solventes orgânicos voláteis tóxicos e não requer o uso de uma etapa de retroextração. A dispersão do extratante foi obtida com o uso de ultrassom. Um TSIL, tiosalicilato de trioctilmetilamônio (TOMATS), foi usado como agente de extração e complexação. Após a microextração, a fase TOMATS foi separada por centrifugação e dissolvida em etanol antes da análise por TSIL-USA-DLLME e ET AAS. Para os suplementos vitamínicos, 0,350 g de amostra moída foram digeridos com 1 mL de peróxido de hidrogênio a 30%, 4 mL de ácido nítrico a 65% e 1,5 mL de ácido fluorídrico a 40%. Foram adicionados 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 30% e 5 mL de HNO <sub>3</sub> a 65% para o Material de referência certificado em pó ou chá. A exatidão foi avaliada através de vários materiais de referência certificados, incluindo farinha de soja, folhas de chá, água, mistura de ervas polonesas, Água do Lago Ontário e NIST 1643e. Os teores de cobalto medidos estavam em concordância satisfatória com as concentrações certificadas com base no teste <i>t de Student</i> . Foi	35

			realizado a técnica de calibração de padrão externo com soluções aquosas. Foi utilizado $Mg(NO_3)_2$ como modificador.	
Pb e Cd	Suplementos alimentares	GF AAS	Foi pesada massa de 0,5 g da amostra homogeneizada e triturada, e adicionado 5 mL $HNO_3$ e 1 mL $H_2O_2$ e submetida à mineralização. A solução obtida após a mineralização e foram analisadas por GF AAS após a mineralização úmida. A calibração foi feita por padrões aquosos e a validação do método foi avaliada testando o material de referência SRM 3280 em triplicado. A recuperação de chumbo e cádmio no SRM 3280 foi superior a 95,0%. Verifica-se também que chumbo e cádmio foram encontrados em 68% das amostras, os valores obtidos tanto para o chumbo como para o cádmio enquadram-se nos limites impostos pela legislação em vigor.	36
Cr, Cu, Fe, Mn, Se, As, Cd e Pb	Suplementos dietéticos multivitamínicos	HR-CS GF AAS	As amostras foram analisadas na forma de suspensão. Para o preparo das suspensões foi usado $HNO_3$ 3 mol $L^{-1}$ e Triton X-100 0,1% (v/v) e 7minuto de agitação ultrassônica. Para avaliar a exatidão materiais de referência certificados hepatopâncreas de lagosta, músculo de cação, fígado de cação, folhas de espinafre e folhas de tomate foram analisados empregando o mesmo preparo. As temperaturas de pirólises ótimas estabelecidas foram entre 600 e 1300 °C e de atomização variaram entre 1300 e 2300 °C para As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Se. No estudo foram utilizados modificadores químicos. A calibração foi baseada no método de adição padrão.	37
Fe e Ni	Suplementos multiminerais	HR-CS GF AAS	Foi feita a determinação simultânea de Fe (352,604 nm) e Ni (352,454 nm). As temperaturas de pirólise e atomização para	38

	e multivitamínicos		Fe e Ni foram 1000 e 2700 °C, respectivamente. Não foi necessário o uso de modificador químico. Para garantir a homogeneidade, as amostras sólidas foram trituradas e bem misturadas em almofariz e pilão, enquanto as amostras em cápsulas foram abertas e o conteúdo analisado diretamente, sem pré-tratamento, com calibração com padrões aquosos. Para validar os resultados analíticos, foi realizada uma digestão úmida das amostras, que foram tratadas com uma mistura de 3 mL de HNO <sub>3</sub> 65% (v/v) e 1,5 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v), aquecidas em bloco digestor e as soluções resultantes foram analisadas por HR-CS GF AAS. Soluções padrão aquosas foram utilizadas para calibração.	
Pb	Suplementos dietéticos	HR-CS GF AAS	Os comprimidos foram moídos e misturados antes da análise, enquanto as cápsulas foram abertas, e o conteúdo foi analisado diretamente sem qualquer pré-tratamento. Foram pesadas massas das amostras entre 0,8 - 1,0 mg e inseridas diretamente no forno de grafite. Foi usada a linha de ressonância do Pb de 283,306 nm. As temperaturas de pirólises foram de 600 e 1300 °C e de atomização foi de 2200 °C. No estudo houve o uso de modificador químico Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> e Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . A validação do método a partir do material de referência contendo laranja amarga SRM 3260. O método é simples, sensível e preciso, utilizando calibração com padrões aquosos.	39
Cd e Pb	Suplemento alimentares oleosos	HR-CS GF AAS	O método baseou-se na formação e quebra de uma emulsão água-em-óleo (EIEB), seguida pela análise dos íons extraídos usando GF AAS. As amostras de óleo foram previamente	40

---

diluídas em 1,5 mL de tolueno. A solução extratora, composta por 5% de Triton X-100 e 15% de ácido clorídrico (HCl), foi adicionada às amostras para formar uma emulsão água-em-óleo. Foi analisada a fase aquosa ácida, que continha os íons extraídos dos analitos. As temperaturas de pirólise/atomização foram de 600 °C (pirólise), e 1400 °C/ 1200 °C (atomização) para Pb e Cd, respectivamente. Os resultados foram comparados com um procedimento de decomposição ácida em bloco digestor aberto. Pd/Mg foi utilizado como modificador químico. Foi possível quantificar Cd em duas amostras e Pb em uma amostra, usando o método de adição padrão para calibração.

---

Na técnica de ICP OES uma solução de amostra é transportada para o nebulizador que produz um aerossol, que é arrastado pelo gás argônio até o plasma<sup>41-42</sup>. Esta fonte energética atinge temperaturas de 6.000 a 10.000 K nas quais os átomos e íons do analito são termicamente excitados e emitem radiação eletromagnética em seus comprimentos de onda característicos, ao retornarem a estados de menor energia.

Na técnica de ICP-MS o plasma de argônio é mais uma vez a fonte de atomização e excitação dos átomos e íons dos analitos. Nessa técnica o plasma indutivamente acoplado é hifenado a um espectrômetro de massa. Os íons gerados no plasma de argônio são introduzidos no espectrômetro de massa aonde são separados em função da razão massa/carga através do transporte sob ação de campo eletromagnético e chegam ao detector<sup>41</sup>.

Dentre as principais vantagens das técnicas de plasma se destacam a determinação multielementar, a elevada sensibilidade, seletividade e a capacidade de medições isotópicas no caso da ICP-MS. Quanto as desvantagens, destacam-se a relativa intolerância à matrizes complexas (a presença de sólidos dissolvidos e/ou compostos orgânicos) e a necessidade de digestão das amostras, o que pode resultar na adição de uma etapa de preparo de amostra ao tempo de análise, além de estabelecer uma condição compromisso para todos os analitos, ou seja, nem sempre será utilizada a condição ótima de cada elemento para determinação<sup>42</sup>.

Outra técnica utilizada na determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares, apesar de menor aplicação, é a espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda para determinação multielementar (WDXRF). Que se baseia na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos presentes na amostra sólida e/ou líquida. No entanto, devido às suas limitações (requer equipamento especializado, preparação de amostras mais complexa, análise de elementos específicos, custo e manutenção) ela não é amplamente utilizada para análise de rotina, a menos que haja uma necessidade específica de detectar elementos que são desafiadores para outras técnicas, por isso não é

feito o uso rotineiro da técnica, apesar de apresentar elevada sensibilidade para determinação de Hg, Sb, As, Se e Te<sup>26-27</sup>.

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é comumente utilizada na determinação de elementos em baixas concentrações presentes numa variedade de amostras, como suplementos alimentares, seja líquidas e/ou sólidas. Dentre os atomizadores reportados na literatura para tais análises os mais comuns são a atomização com chama (FAAS) e com forno de grafite (GF AAS), que serão descritos na próxima seção.

Apesar de vários trabalhos apresentados, Tabela 2, que abordam a determinação de metais em suplementos alimentares, ainda não há trabalho na literatura que reporte a determinação sequencial e simultânea de Cd, Cr e Fe em suplementos alimentares. Portanto, isso revela a necessidade de trabalhos voltados para a determinação sequencial e simultânea desses analitos presentes nesse tipo de matriz a partir da análise direta, oferecendo uma alternativa mais eficiente em comparação com os métodos tradicionais que envolvem a digestão ácida e/ou com determinação monoelementares.

A Tabela 2 apresenta alguns trabalhos que fazem uso da análise direta de amostras sólidas empregando AAS ou HR-CS AAS com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF). Esta forma de introdução da amostra apresenta vantagens significativas quando comparada aos métodos de decomposição ácida, tais como: um pré-tratamento das amostras mais simples e rápido; menores riscos de contaminações das amostras, já que evita o uso de reagentes para dissolução, bem como a menor manipulação das amostras; menores perdas de analito (por volatilização ou adsorção); menor insalubridade para o analista, já que não requer reagentes tóxicos ou corrosivos; menor geração de resíduos; maior detectabilidade do analito, uma vez que as amostras não precisam ser diluídas e possibilidade de se analisar uma pequena quantidade de amostra (geralmente abaixo de 1 miligrama, por replicata)<sup>43</sup>.

Devido a essas características, a análise direta de sólidos por GF AAS (SS-GF AAS) tem se mostrado muito atrativa e promissora para a determinação de elementos químicos em níveis de traços e ultra-traços em diversos tipos de



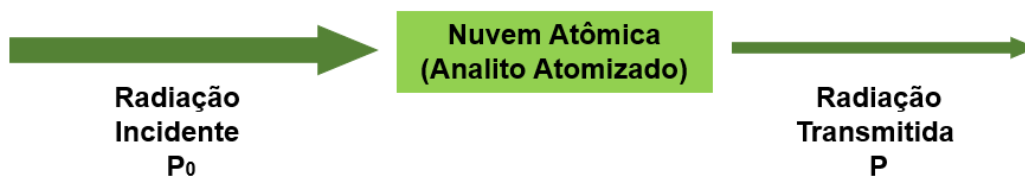
amostras sólidas, e vem se concretizando como uma alternativa rápida e simples<sup>46</sup>. Além das vantagens já apresentadas, vale destacar outra característica importante dessa técnica que é a possibilidade de calibração externa, o que é muito incomum nas técnicas que empregam a análise direta de sólidos, sendo essa uma abordagem mais simples e econômica do que o uso de materiais de referência certificado<sup>44</sup>.

No entanto, apesar das vantagens mencionadas, há limitações relacionadas a interferências espectrais associadas a matriz da amostra, que normalmente não são corrigidas pela instrumentação tradicional de fonte de linha (LS). O advento da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) possibilitou que todo o ambiente espectral da linha analítica torna-se "visível". Em contraste com a espectrometria de absorção com fonte de linha (LS AAS), no HR-CS AAS obtêm-se informações tridimensionais sobre a absorbância ao longo do tempo e comprimento de onda, isso ajuda muito a reconhecer e evitar interferências espectrais. Além disso, a técnica possibilita a determinação sequencial e simultânea de mais de um elemento químico<sup>44-45</sup>, assuntos abordados nas seções seguintes.

### **3.5 Espectrometria de absorção atômica e a análise direta de sólidos**

A espectrometria de absorção atômica (AAS) consiste no princípio de que átomos livres no estado gasoso absorvem radiação eletromagnética de frequência específica proveniente de uma fonte de radiação e utiliza esse fenômeno para determinação quantitativa de diversos metais e metaloides<sup>46-47</sup>.

Assim, a radiação incidente ( $P_0$ ) é atenuada quando passa pela amostra contendo o analito (a "nuvem de átomos") no atomizador. Isso resulta em uma intensidade de radiação transmitida ( $P$ ) menor que chega ao detector, conforme apresentado na Figura 1. Essa atenuação da radiação acontece devido à transferência de energia para o átomo, promovendo sua transição do estado de menor energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado).



**Figura 1.** Princípio da espectrometria de absorção atômica. A radiação incidente ( $P_0$ ) é absorvida pelo analito (nuvem atômica) presente na amostra atomizada, resultando em um feixe transmitido de menor intensidade ( $P$ ). (Fonte: adaptado de (Welz *et al*)).

É possível se obter a transmitância através da razão entre  $P/P_0$ . Então, é aplicado a função logarítmica do inverso da transmitância para se obter a absorvância, a qual possui uma relação linear, com a concentração do analito. A relação entre absorvância e concentração é apresentada na Equação 1 e é conhecida como Lei de Lambert-Beer<sup>46-47</sup>.

$$A = -\log \frac{P}{P_0} = a \cdot b \cdot c \quad \text{Equação 1}$$

em que,  $A$  é a absorvância,  $P$  é a radiação incidente,  $P_0$  é intensidade da radiação transmitida,  $a$  é a absortividade,  $b$  o caminho óptico e  $c$  a concentração do analito na amostra<sup>46</sup>.

As fontes de radiação mais utilizadas nos espectrômetros convencionais são as lâmpadas de cátodo oco (HCL- do inglês *Hollow Cathode Lamp*), chamadas de fontes de linha que, como o nome indica, são lâmpadas que emitem radiação no(s) comprimentoo(s) de onda específico(s) de cada elemento de interesse, tornando a técnica altamente seletiva. Com isso, a técnica também pode ser chamada de Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS)<sup>46-47</sup>.

Nos espectrômetros de fonte de linha são usados monocromadores de baixa resolução, os quais têm a função de isolar a linha analítica das outras linhas espectrais emitidas pela lâmpada. Ele é composto por uma rede de difração que decompõe o feixe de radiação nos comprimentos de onda e está associado a duas fendas estreitas que servem para controlar a entrada e saída

da radiação do monocromador. Ao passar pelo monocromador, a radiação chega ao detector, um tubo fotomultiplicador, onde é então convertida em sinal elétrico, amplificado e ao final registrado como absorvância<sup>46-47</sup>.

A atomização é a função fundamental de uma análise por AAS. Essa etapa consiste em converter o analito em átomos livres no estado gasoso que absorvem energia da lâmpada. Para a técnica existem três tipos de atomizadores comercialmente disponíveis: chama, forno de grafite e tubo de quartzo<sup>46-47</sup>.

Inicialmente foi empregado o atomizador com chama (F AAS) no desenvolvimento dos primeiros espectrômetros de absorção atômica. Por conta da simplicidade, a F AAS é a técnica mais utilizada para determinações elementares a nível de ppm. Porém, apresenta elevados limite de detecção, quando comparado com forno de grafite<sup>46</sup>.

A técnica de forno de grafite (GF AAS-) foi desenvolvida por L'vov em 1959<sup>46</sup>. É amplamente utilizada na determinação de elementos em baixas concentrações, ppb. Nessa técnica, uma alíquota da amostra, sólida ou líquida, é inserida no interior do tubo de grafite, o qual vai ser submetido a um programa de aquecimento que é aquecido gradativamente de tal forma que o solvente e a matriz sejam removidos garantindo que somente o analito esteja disponível na etapa de atomização. Nessa etapa o analito é vaporizado, na forma atômica, no estado fundamental, em um curto intervalo de tempo, gerando um sinal transiente em função do tempo<sup>46-49</sup>.

Mesmo com o advento da técnica de GF AAS, até meados de 1980 a técnica apresentava algumas limitações, já que os fornos não apresentavam isotermicidade temporal e/ou espacial. Foi quando em 1981, ocorreu a evolução de GF AAS por Slavin, que propôs o conceito de forno-plataforma de temperatura estabilizada (STPF- do inglês, *Stabilized Temperature Platform Furnace*)<sup>48</sup>.

O conceito estabelece parâmetros para a obtenção de um bom desempenho analítico em forno de grafite, isto é, com o menor número possível de interferências, tornando-a, sensível, versátil e confiável para determinação de elementos traços numa ampla variedade de amostras. Os conceitos STPF são:

- (a) O uso de elevadas taxas de aquecimento na etapa de atomização no forno de grafite;
- (b) Uso de forno aquecido transversalmente;
- (c) Tubo de grafite com revestimento de grafite pirolítico;
- (d) Cálculo das concentrações dos analitos a partir das áreas dos sinais analíticos (integração do sinal transiente);
- (e) Emprego de fonte de aquecimento que proporcione taxa de aquecimento elevada;
- (f) Uso de modificadores químicos<sup>46-48</sup>.

O programa de aquecimento, citado acima, envolve as etapas de secagem, pirólise, atomização e limpeza do forno. A primeira etapa consiste na eliminação do solvente. Já pirólise é empregada para eliminar a matriz sem a perda do analito. Em seguida ocorre a etapa de atomização onde são gerados os átomos livres no estado fundamental na forma gasosa. Por fim, a etapa de limpeza garante a eliminação de quaisquer resquícios do analito da medida<sup>48</sup>. É usado gás de purga em todas as etapas, com exceção da etapa de atomização, quando o fluxo de gás interno é interrompido, para evitar a dispersão da nuvem atômica e obter a máxima sensibilidade, exceto quando necessário<sup>49</sup>.

Para garantir a completa separação do analito da matriz é necessário empregar a temperatura de pirólise mais elevada possível, desde que não haja perda do analito durante essa etapa. Logo existem limitações para uso da temperatura máxima. Assim, faz-se uso de uma das condições STPF, o modificador químico<sup>49</sup>.

O modificador químico tem sido recomendado para evitar perdas do analito e facilitar a eliminação dos concomitantes ou para tornar a matriz mais volátil. É um reagente de elevada pureza que é adicionado às amostras e soluções padrões com o objetivo de uniformizar o comportamento do analito a partir dos padrões e amostras. Quando o modificador químico reage com o analito, ele converte esse em espécies mais estáveis termicamente, sendo possível o uso de temperaturas de pirólise mais elevadas que na ausência de modificador, garantindo assim, a eliminação da matriz sem a perda do analito. Alternativamente, é possível o uso de modificador químico para tornar a matriz

mais volátil de modo que a mesma seja eliminada em temperaturas mais baixas<sup>49</sup>.

A escolha de um bom modificador químico deve obedecer a alguns requisitos como estabilizar o maior número de elementos possíveis até uma temperatura relativamente alta, não deve ter um efeito negativo na vida útil do tubo, deve estar disponível a um elevado grau de pureza para evitar que haja introdução de brancos valores, não deve provocar radiação de fundo alta<sup>49</sup>.

Com isso, a mistura de nitrato de paládio com nitrato de magnésio foi proposta por Schlemmer e Welz<sup>50</sup> como modificador universal, após verificação do desempenho satisfatório para 21 elementos químicos. Logo, é o modificador químico com mais ampla aplicação descrito até o momento<sup>51</sup>.

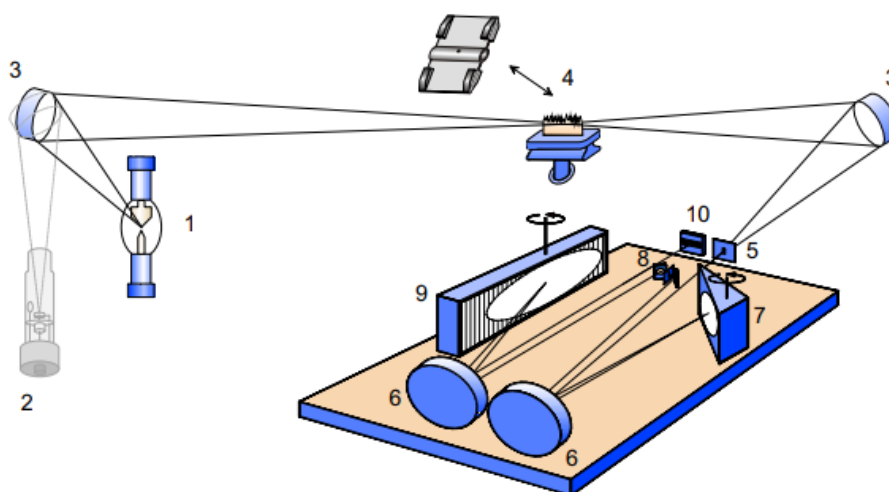
Por conta de todas as vantagens apresentadas, a técnica de GF AAS tem sido amplamente empregada. Porém, a análise direta de amostras sólidas pela técnica LS GF AAS apresenta algumas limitações, principalmente associadas as interferências espectrais causadas pela matriz da amostra, as quais não podem ser corrigidas apropriadamente pela instrumentação clássica de fonte de linhas<sup>52</sup>.

### **3.6 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua**

No final do século XX houve uma redefinição completa da instrumentação empregada para medir a absorção atômica. A dedicação de vários pesquisadores aliada a um forte avanço tecnológico permitiu que em 2004 fosse lançado o primeiro modelo comercial de um instrumento de HR-CS AAS pela empresa alemã Analytik Jena (Jena, Alemanha), cuja configuração foi baseada na proposta de Heitmann *et al*<sup>53</sup>, de 1996. Em comparação aos equipamentos utilizados pela LS AAS, todos os atomizadores empregados permaneceram os mesmos<sup>54</sup>.

A configuração de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua é esquematicamente mostrada na Figura 2. O equipamento conta com uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão

cuja emissão compreende a faixa contínua entre 190 e 900 nm.<sup>55</sup>. Ou seja, emite radiação contínua de elevada intensidade numa ampla faixa espectral, tornando possível o uso de qualquer comprimento de onda entre 190 e 900 nm, favorecendo o uso de linhas secundárias e possibilitando a realização de determinações multielementares. Devido à alta intensidade da lâmpada a razão sinal/ruído (S/N) é alta, o que garante boa precisão às medidas e contribui para melhores limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ). A intensidade de emissão, desta forma, excede a de uma lâmpada de cátodo oco em pelo menos 1 a 3 ordens de magnitude<sup>53</sup>.

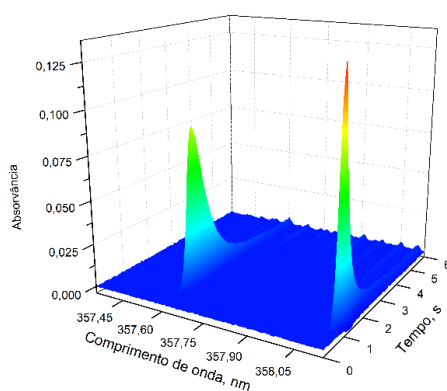


**Figura 2.** Representação esquemática dos principais componentes de um espectrômetro de HR-CS AAS. (1) Lâmpada de arco curto de xenônio; (2) lâmpada de Neônio; (3) espelhos elipsoidais; (4) atomizador; (5) fenda de entrada do monocromador; (6) espelhos parabólicos; (8) monocromador de alta resolução é representado pela combinação de um prisma (7) e uma rede de difração *echelle* (9), detector (10). (Welz *et al.*).

O seletor de comprimento de ondas é um monocromador duplo de alta resolução (DEMON) composto por um prisma e uma rede *echelle*. O prisma desempenha o papel de pré-dispersão da radiação contínua, através de uma fenda intermediária a faixa espectral de interesse vai ser selecionada e direcionada para o segundo monocromador, a rede *echelle*, que faz uma

segunda dispersão e fornece a alta resolução nas vizinhanças da linha analítica<sup>56</sup>. Essa radiação é encaminhada ao detector para registro do sinal.

A radiação atinge o detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivo de carga acoplada (CCD), sendo usados 588 pixels completamente independentes com 200 deles para fins analíticos. Isto significa que todo o ambiente espectral a  $\pm 200$  pm ao redor da linha analítica, na região do ultravioleta, e até  $\pm 500$  pm na região visível do espectro torna-se “visível”, fornecendo uma série de informações indisponíveis em instrumentos de LS AAS. Logo, isso permite a visualização da região espectral no entorno da linha analítica principal<sup>57</sup>. Com isso, é possível avaliar o comprimento de onda como terceira dimensão, imagem tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda, que certamente é uma ferramenta valiosa para a interpretação de resultados e a compreensão das características espectrais de uma amostra, tornando a técnica mais informativa para análises qualitativas e quantitativas como representado na Figura 3.



**Figura 3.** Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança das linhas analíticas de cromo e ferro entre 357,45 e 358,08 nm, para uma solução padrão.  $T_{\text{pir Cd}}$ : 1700 °C;  $T_{\text{atm Cr,Fe}}$ : 2600 °C.

Além da fonte de radiação ser de alta intensidade em HR-CS AAS, a combinação do monocromador e detector de alta resolução compete a técnica grandes inovações e vantagens. As principais são:

- a) Uso de uma única fonte de radiação para determinação de vários elementos químicos, possibilitando o monitoramento simultâneo de linhas atômicas próximas, permitindo a realização de determinações multielementares.
- b) Melhora na razão S/N por conta da alta intensidade de emissão da lâmpada de arco curto de Xe.
- c) Ausência de linhas fracas, já que a emissão é contínua e a intensidade é aproximadamente uniforme em várias regiões espectrais, possibilitando que um analito, presente em alta concentração numa dada amostra, possa ser monitorado utilizando uma linha alternativa, diminuindo a necessidade diluições.
- d) Toda a região espectral na vizinhança da linha analítica torna-se visível, possibilitando obter muito mais informações, por exemplo a respeito do fundo, indisponíveis em aparelhos de LS AAS.
- e) Correção simultânea da radiação do fundo nas proximidades da linha analítica.
- f) Possibilidade de armazenar espectros de referência de moléculas diatômicas causadoras de interferências espectrais. O espectro de referência é subtraído do espectro da amostra através de um algoritmo de mínimos quadrados (LSBC).
- g) Correção automática para todos os eventos contínuos, recursos para monitorar “linhas” moleculares que permite a determinação de não-metals e outros fenômenos em banda larga como emissão do atomizador<sup>57-58</sup>.

Na técnica HR CS AAS, cada parte da linha analítica é medida por um pixel individual no detector (volume do pico). Isso significa que diferentes partes da linha analítica podem ser avaliadas separadamente, permitindo uma análise mais detalhada. A partir dessas características, Heitmann *et. al*<sup>53-54</sup>, exploraram a detecção fornecida por um CCD como ferramenta para aumentar ou reduzir a sensibilidade analítica, dependendo do número de *pixels* usados para avaliar o sinal. Uma combinação frequentemente usada para monitorar o sinal analítico é o uso de 3 *pixels*, CP  $\pm$  1, onde CP representa o *pixel* central e  $\pm$  1 refere-se aos próximos *pixels*, à esquerda e à direita do *pixel* central. Essa configuração é eficaz para melhorar a sensibilidade analítica e para obter melhores limites de



detecção (LOD), em concentrações baixas, através da razão sinal ruído. Por outro lado, se o analito estiver em alta concentração, é possível monitorar apenas as asas do pico, os *pixels* laterais, (desconsiderando o *pixel* central), esses *pixels* adjacentes podem ser empregados para a redução da sensibilidade analítica e expandir a faixa linear de trabalho<sup>54</sup>.

Como mencionado, em HR-CS AAS é usado uma fonte contínua de radiação de alta intensidade, então todas as linhas de absorção dos elementos químicos da faixa espectral (de 190 a 900 nm) são acessíveis<sup>45</sup>. Logo, é possível monitorar linhas analíticas menos sensível, o que possibilita a determinação simultânea de mais de um elemento químico, desde que: *i*) as linhas analíticas deles estejam na mesma janela espectral, isto é, a uma distância de 0,2–1,0 nm, dependendo do comprimento de onda; *ii*) e que os mesmos tenham comportamento térmico semelhantes, isto é, temperaturas de atomização próximas<sup>56</sup>. Além disso, a sensibilidade das linhas empregadas deve ser adequada às concentrações dos analitos na amostra.

A técnica também oferece a capacidade de determinar sequencialmente os analitos, a partir de uma única alíquota da amostra inserida no forno. Nesse caso, são determinados elementos químicos com comportamentos térmicos distintos, sendo o mais volátil determinado primeiro e o menos volátil na sequência. Assim, atomiza-se o elemento mais volátil, monitorando a região da linha analítica desse elemento e, na sequência, troca-se para comprimento de onda do segundo elemento e aplica-se uma nova etapa de atomização e faz-se a leitura do sinal analítico do elemento menos volátil<sup>56</sup>. A exemplo, os estudos proposto por Gómez-Nieto *et al*<sup>59</sup> para determinação sequencial de Cd e Cu em leite em pó e fórmulas infantis por amostragem direta de sólidos e o trabalho dos Santos *et al*<sup>60</sup> que usaram a abordagem sequencial e simultânea para a determinação direta de Cd, Ni e Fe em sementes comestíveis, que propuseram um método analítico com duas temperaturas de atomização de 1600 °C para Cd e de 2500 °C para Ni e Fe, respectivamente.

A interferência espectral ocorre quando o sinal o analito se sobrepõe aos sinais de outros elementos químicos ou moléculas presentes na amostra<sup>49</sup>. Essa sobreposição de sinais pode resultar em medidas imprecisas ou errôneas do

analito de interesse. Na análise direta de amostras sólidas todos os constituintes da matriz da amostra estão presentes e podem ser uma fonte de interferência espectral<sup>61</sup>. Na HR-CS AAS, como todos os eventos são monitorados simultaneamente, a correção de interferências espectrais é muito mais eficiente. Eventos contínuos são corrigidos automaticamente. Interferências espectrais, de fundo estruturado, ocasionadas por moléculas diatômicas podem ser corrigidas usando LSBC. A correção usando LSBC pode ser feita desde que seja possível obter um espectro de referência adequado, ou seja, um espectro no qual apenas as espécies interferentes estão presentes<sup>56</sup>. Esse espectro é armazenado no *software* e subtraído do espectro da amostra usando a ferramenta de LSBC de modo que apenas o sinal de absorção atômica do analito seja medido<sup>54</sup>.

Além do mais, como qualquer linha do espectro está disponível, “linhas” de absorção molecular referentes a transições eletrônicas vibracionais rotacionais das moléculas diatômicas, podem ser usadas para determinação quantitativa de não metais. Ao usar a HR-CS AAS, é possível selecionar a faixa espectral relevante para o monitoramento da molécula de interesse e determinar a concentração de não metais que formem moléculas diatômicas no atomizador<sup>57</sup>.

A HR-CS AAS representa um avanço significativo em relação à AAS convencional, superando várias de suas limitações. A capacidade de realizar análises simultâneas de múltiplos elementos químicos, além da alta resolução, detecção de baixo limite e capacidade de minimizar ou eliminar interferências, o que a torna adequada para análise direta, são características valiosas dessa técnica.

## 4. Parte experimental

### 4.1 Instrumentação e condições experimentais

Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (modelo contrAA, 700 AnalytikJena AG, Jena, Alemanha). O equipamento é equipado com atomizadores de chama e tubo de grafite aquecido transversalmente, em compartimentos separados. A fonte de radiação é uma lâmpada de arco curto de Xe, que opera sob alta pressão no modo “*hot-spot*”, que emite espectro contínuo entre 190 e 900 nm. O espectrômetro é equipado com um monocromador duplo de alta resolução (prisma e rede de difração *echelle*) e um dispositivo de carga acoplada (CCD), com 588 pixels, sendo 200 deles usados para fins analíticos.

Os experimentos foram realizados utilizando tubos de grafite piroliticamente recobertos para amostragem de sólidos, sem orifício dosador, (AnalytikJena, Part no. 407-A81.303), e plataformas de grafite para análise de sólidos (AnalytikJena, Part no. 407-152.023). Uma microbalança M2P (Sartorius, Göttingen, Alemanha), com precisão de 0,001 mg, foi utilizada para a pesagem das amostras diretamente na plataforma. Um par de pinças, que é parte do amostrador manual para sólidos (Modelo SSA 6 AnalytikJena AG, Jena, Alemanha), foi usado para transferir a plataforma de grafite para o atomizador. O gás argônio (Ar) com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás de purga e de proteção, com fluxo máximo ( $2,0 \text{ L min}^{-1}$ ) durante todas as etapas, exceto na atomização, quando foi ajustado conforme o teor de analito presente nas amostras. O programa de aquecimento do forno de grafite utilizado no presente estudo está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação simultânea e sequencial de Cd, Cr e Fe *via* HR-CS GF AAS utilizando a análise direta de amostras sólidas.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Rampa (°C s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Patamar (s)</b>	<b>Gás de purga (L min<sup>-1</sup>)</b>
Secagem	120	10	30	2
Pirólise 1	700	300	40	2
Atomização Cd	1700	2500	6	0 ou 0,1
Troca de comprimento de onda				
Pirólise 2	1700	300	1	2
Atomização Cr e Fe <sup>a</sup>	2600	FP	6	0 ou 0,1
Limpeza	2600	0	4	2

<sup>a</sup> Para determinação simultânea de Cr e Fe

O sinal de absorção atômica foi monitorado através das linhas analíticas de 228,802 nm para Cd (100% de sensibilidade), 357,869 nm para Cr (100% de sensibilidade) e 358,120 nm para o Fe (1% de sensibilidade), avaliando o *pixel* central (CP) e os dois *pixels* laterais de todos os analitos, Cd ( $100 \pm 1$ ), Cr ( $66 \pm 1$ ) e Fe ( $193 \pm 1$ ). Os sinais de Cr e Fe foram monitorados simultaneamente.

As amostras apresentaram concentrações de Cr e Fe distintas, levando a necessidade de alguns ajustes nas condições instrumentais relacionadas à vazão de Ar durante a etapa de atomização e ao número de *pixels* utilizados para avaliar os valores de  $A_{int}$ . As diferentes condições instrumentais utilizadas são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições instrumentais utilizadas durante a etapa de atomização e avaliação do sinal de Cd, Cr e Fe.

<b>Condição</b>	<b>Analito</b>	<b>Fluxo de Ar na atomização (L min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pixels</b>	<b>Faixa de trabalho</b>
<b>1</b>	Cd	0,0	CP±1	0,25 - 8 µg L <sup>-1</sup>
	Cr	0,0	CP±1	2,5 - 60 µg L <sup>-1</sup>
	Fe	0,0	CP±1	0,25 - 6 mg L <sup>-1</sup>
<b>2</b>	Cd	0,1	CP±1	1,0 - 8 µg L <sup>-1</sup>
	Cr	0,1	CP±1	10 - 60 µg L <sup>-1</sup>
	Fe	0,1	CP±1	2,0 - 6 mg L <sup>-1</sup>
<b>3</b>	Cr	0,1	-3/+3	180 - 800 µg L <sup>-1</sup>
	Fe	0,1	-3/+3	40 - 300 mg L <sup>-1</sup>

No desenvolvimento do método, primeiramente foi adotada a condição 1 por conta da concentração relativamente baixa de Cd, Cr e Fe na maioria das amostras, sendo essa a condição mais sensível para todos os elementos. Para a quantificação daquelas amostras de suplementos alimentares que apresentavam altas concentrações de Cr e Fe foi utilizada a condição 2 e 3, da Tabela 4, isto é, fluxo mínimo de Ar durante a etapa de atomização (0,1 L min<sup>-1</sup>), CP ±1 e as asas do pico (*pixels* -3 e +3), respectivamente.

#### 4.2 Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau analítico durante todo o desenvolvimento do trabalho. Água ultrapura com resistividade de 18 MΩ cm, foi obtida através de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e foi utilizada para o preparo das soluções, diluições e limpeza dos materiais empregados. O procedimento de limpeza das vidrarias utilizadas nesse trabalho consistiu na imersão dessas em uma solução de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt, Alemanha) por, no mínimo, 24h e posterior lavagem com água ultrapura. Em seguida, as vidrarias foram secas em uma capela de fluxo laminar modelo Hexiclean (Biosystem, Curitiba, Brasil).

Foram preparadas soluções padrão multielementar intermediárias a partir das soluções estoque de Cd e Cr, de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Specsol, Jacareí, Brasil), com exceção do Fe. A partir das soluções intermediárias de Cd e Cr, com concentrações de  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, e da solução estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe, foi preparada a solução padrão de trabalho. Essa solução foi utilizada para o preparo dos padrões das curvas de calibração e de uma solução padrão de trabalho contendo  $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  Cd,  $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  Cr e  $2 \text{ mg L}^{-1}$  Fe, em  $\text{HNO}_3$   $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ , que foi utilizada para a otimização das condições experimentais. Para fins de organização essa solução será chamada de Padrão de Referência. Foi empregado  $10 \text{ } \mu\text{L}$  dessa solução, resultando nas massas de  $20 \text{ pg}$  de Cd,  $0,2 \text{ ng}$  Cr e  $20 \text{ ng}$  Fe, no forno. Brancos analíticos também foram realizados durante todo o procedimento para corrigir possíveis contaminações dos reagentes utilizados para o preparo das soluções padrões, modificadores e digestões das amostras.

Soluções de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foram usadas como modificador químico. A solução de  $0,05\%$  (m/v) Pd +  $0,03\%$  (m/v) Mg +  $0,05\%$  (v/v) Triton X-100 foi preparada a partir de soluções estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Pd e Mg, ambos na forma de nitrato, (Specsol, Quimlab, Brasil) e do reagente Triton X-100 concentrado (Merck). A solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1\%$  (v/v) foi preparada a partir do ácido concentrado (Merck).

O espectro de referência da molécula diatômica MgF, que foi usado para correção de fundo por LSBC, foi gerado a partir da introdução de  $6 \text{ } \mu\text{L}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$   $1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $6 \text{ } \mu\text{L}$  NaF  $1 \text{ g L}^{-1}$  e  $10 \text{ } \mu\text{L}$  Pd/Mg no forno de grafite.

### **4.3 Amostras e material de referência certificado**

Amostras de suplementos alimentares foram adquiridas em farmácias e lojas especializadas de Porto Alegre, Brasil. As amostras são comercializadas em três diferentes formas: pó, cápsulas e comprimidos. Na Tabela 5 estão apresentadas as amostras analisadas, juntamente com seu código, as maneiras como cada amostra é comercializada, assim como as quantidades mínimas e máximas de consumo diário recomendadas pelos fabricantes.

**Tabela 5.** Tipos de amostras de suplementos alimentares avaliadas, códigos, faixa etária recomendada, formas de comercialização e recomendação de consumo diário pelo fabricante.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Código</b>	<b>Faixa Etária Recomendada</b>	<b>Forma de Comercialização</b>	<b>Recomendação do fabricante (g de suplemento por dia)</b>
Proteína	WP01	≥ 19 anos	Pó	1 a 2 porções (35 g à 70 g/dia)
	WP02	≥ 19 anos	Pó	35 g/dia
Coenzima	CE	≥ 19 anos	Cápsula	1 cápsula/dia (0,65 g/dia)
Colágeno	CO01	≥ 19 anos	Pó	1 sachê/dia (12 g)
	CO02	≥ 19 anos	Pó	10 g/dia
Indutor de sono	IS	≥ 19 anos	Pó	5 g/dia
Multivitamínicos	PV01	≥ 50 anos	Cápsula	2 cápsulas/dia(1,1g)
	PV02	≥ 19 anos	Cápsula	1 cápsula/dia
	PV03	≥ 3 anos	Comprimido	1 comprimido/dia (0,630 g/dia)
Vitamina	VD	≥ 19 anos	Comprimido	1 comprimido/dia (1,260g/dia)

Para as medidas, todas as amostras foram inseridas diretamente na plataforma de grafite, com simples preparo das amostras. As amostras comercializadas tiveram como único tratamento a abertura das cápsulas e transferência do conteúdo para frascos de plástico. A amostra PV03, na forma de comprimido, foi moída com o auxílio de micromoinho A-11 Basic (IKA-Werke, Alemanha) e a amostra VD foi macerada em um almofariz e pistilo de ágata, para então ser feita as análises de seu pó. A amostra CE foi seca na estufa devido a sua umidade, durante 1 h à 80 °C. Todas as amostras foram armazenadas em tubos plásticos até o momento da análise.

A exatidão do método foi avaliada através do material de referência certificado SRM NIST 1573a de folha de tomate (*National Institute of Standards and Technology*, Estados Unidos), já que não havia CRM de suplemento alimentar disponível no laboratório. O SRM foi submetido ao mesmo procedimento que as amostras, foi analisado diretamente, porém primeiramente foi secado em estufa por conta da umidade apresentada.

#### **4.4 Modificadores químicos**

Primeiramente, foi feita a investigação do uso de 10  $\mu\text{L}$  Pd/Mg 0,05/0,03% (m/v) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% (v/v), como modificadores químicos nas amostras CE, CO01, IS, WP01 e PV01, que representam os diferentes tipos de amostras avaliadas. Para o estudo da massa do modificador químico na determinação multielementar de Cd, Cr e Fe em suplementos alimentares foram avaliados diferentes volumes de uma solução contendo 0,05% (m/v) Pd, 0,03% (m/v) Mg e 0,05% TritonX-100. Este estudo foi realizado com 10  $\mu\text{L}$  da solução do padrão de referência, correspondendo a massas de 20 pg Cd, 0,20 ng Cr e 20 ng Fe no forno de grafite, e com as amostras PV01 e WP01.

Os ensaios com o padrão de referência foram realizados em triplicata e com as amostras em quintuplicata. Em ambos os casos, variou-se o volume de modificador de 0 a 20  $\mu\text{L}$ , o que corresponde a massas de 0 a 10/6  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, no forno de grafite.

#### **4.5 Procedimento analítico**

As soluções padrão e do branco foram pipetadas (10  $\mu\text{L}$ ) diretamente na plataforma de grafite, manualmente com auxílio de micropipeta, e em seguida foi pipetado o modificador químico, usando um volume de 10  $\mu\text{L}$  da solução de 0,05% (m/v) Pd, 0,03% (m/v) Mg e 0,05% TritonX-100. A plataforma era inserida dentro do forno e então era iniciado o programa de aquecimento (Tabela 3). Tanto as amostras quanto o SRM utilizado foram medidos diretamente na plataforma de grafite utilizando a microbalança e posteriormente era feita a adição de 10  $\mu\text{L}$  do modificador químico. A plataforma era inserida no forno e submetida ao mesmo procedimento das soluções.



Para as curvas de calibração, o volume de 10 µL das diferentes soluções padrão multielementares foram pipetadas diretamente na plataforma de grafite, com a posterior adição de 10 µL do modificador. As dez medidas da solução do branco, para determinação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), foram realizadas a partir da introdução de 10 µL do modificador químico na plataforma. Vale ressaltar que as medidas de  $A_{int}$  para Cd, Cr e Fe foram obtidas a partir da mesma alíquota de amostra/padrão introduzida no forno de grafite, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3.

#### 4.6 Comparação com método analítico de referência

Para avaliar a exatidão do método analítico proposto, além da análise de SRM, foi feita a digestão ácida assistida por micro-ondas (Anton Paar, Mutiwaver Pro) de 2 amostras. Foram aferidas massas em torno 0,1000 ( $\pm 0,0001$ ) g das amostras PV01 e WP02 em papel manteiga, usando balança analítica (Mettler Toledo). As massas foram transferidas para os tubos de politetrafluoretileno (PTFE) e foi adicionado 5 mL HNO<sub>3</sub> bidestilado. Posteriormente os tubos foram fechados e levados ao forno de micro-ondas e submetidos ao programa de aquecimento conforme a Tabela 6, com duração total de 1h09min. As digestões foram feitas em duplicata e realizadas simultaneamente, pois o rotor possui 24 posições.

**Tabela 6.** Programa de aquecimento para digestão das amostras de suplemento alimentares assistida por radiação micro-ondas.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Rampa de temperatura	120	20
Tempo de permanência	120	5
Rampa de temperatura	180	20
Tempo de permanência	180	5
Resfriamento	70	19

Ao final do procedimento de digestão, as amostras foram retiradas do forno de micro-ondas, e após resfriamento, foram transferidas,

quantitativamente, para tubos falcons e avolumadas para 10,0 mL com água ultrapura, para então serem medidas no LS-GF AAS.

#### 4.6.1 Instrumentação de LS-GF AAS e condições experimentais para amostras digeridas

Para a determinação de Cd, Cr e Fe nas soluções resultantes da digestão das amostras foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica, de fonte de linha, equipado com forno de grafite com aquecimento transversal, modelo ZEE nit 650P (Analytik Jena). O sistema de correção de fundo utilizado foi o corretor baseado no efeito Zeeman. Ao espectrômetro foi acoplado um amostrador automático (modelo MPE 60), que controlou a introdução das amostras e modificadores no atomizador. Uma lâmpada de cátodo oco de cada elemento foi utilizada como fonte de radiação: Cd (Hitachi, Tóquio, Japão), Cr (NARVA G.L. E, Berlim, Alemanha), e Fe (IST, Nova York, EUA). As condições instrumentais são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Condições operacionais aplicadas nos métodos analíticos para a determinação de Cd, Cr e Fe por LS-GF AAS.

Parâmetro	Cd	Cr	Fe
Comprimento de onda (nm)	228,8 (100% sensibilidade)	357,9 (100% sensibilidade)	296,7 (12% sensibilidade)
Fenda espectral (nm)	0,8	0,8	0,2
Corrente (mA)	2	4	4
Campo (T)	0,8	0,7	0,8
Alíquota de amostra (µL)	20	10	10
Modificador	Pd/Mg (0,05%/0,03%)	Mg (0,03%)	Mg (0,03%)
Alíquota do modificador (µL)	10	5	5

A Tabela 7 também apresenta os modificadores usados para cada analito, bem como os volumes desses e os volumes das soluções das amostras digeridas e soluções padrão. As soluções de amostra, padrão e modificador

foram introduzidas automaticamente no forno com plataforma integrada para Cd e no forno sem plataforma para Cr e Fe. Gás argônio de alta pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás de purga.

As curvas de calibração dos três analitos foram construídas a partir de diluições sucessivas das soluções padrão monoelementares de 2,5 µg L<sup>-1</sup> Cd, 50 µg L<sup>-1</sup> Cr e 2 mg L<sup>-1</sup> Fe, empregando o amostrador automático. O volume da alíquota de 10 ou 20 µL foi completado com a solução do branco (, HNO<sub>3</sub> 0,014 mol L<sup>-1</sup>). Para as amostras que apresentaram elevadas concentrações de Cr e Fe foram realizadas diluições entre 10 e 250 vezes, em balões volumétricos, com água e adição de HNO<sub>3</sub> com concentração final de 0,014 mol L<sup>-1</sup>. A Tabela 8 apresenta o programa de temperatura empregado nas análises por LS-GF AAS.

**Tabela 8.** Programa de aquecimento aplicado nos métodos analíticos para a determinação de Cd, Cr e Fe por LS-GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Patamar (s)	Gás de purga (L min <sup>-1</sup> )
Secagem I	80	6	20	2,0
Secagem II	90	3	20	2,0
Secagem III	110	5	10	2,0
Pirólise I	350	50	20	2,0
Pirólise II	600 <sup>a</sup> /1300 <sup>b</sup>	300	10	2,0
AZ*	600 <sup>a</sup> /1300 <sup>b</sup>	0	6	0
Atomização	1600 <sup>a</sup> /2600 <sup>b</sup>	1500	6	0
Limpeza	2450 <sup>a</sup> /2600 <sup>b</sup>	500	4	2,0

<sup>a</sup> Para determinações de Cd. <sup>b</sup> Para determinações de Cr e Fe

## 4.7 Parâmetros de mérito

### 4.7.1 Avaliação da exatidão

A exatidão refere-se à concordância dos valores individuais encontrados pelo método desenvolvido com o valor aceito como “verdadeiro” para um elemento em uma dada amostra<sup>47</sup>. Para avaliar se os valores encontrados por LS-GF AAS eram estatisticamente iguais àqueles encontrados por HR-CS GF AAS e se as concentrações determinadas no SRM eram idênticas aos valores de referência foi aplicado o teste *t Student* e o intervalo de confiança.

### 4.7.2 Avaliação da precisão

A precisão das medidas de absorbância reflete a repetibilidade das medidas, ou seja, proximidade dos resultados obtidos da mesma forma<sup>74</sup>. No trabalho, a precisão foi definida a partir do desvio padrão, representado pelas barras de erro, e desvio padrão relativo (RSD), tendo os valores obtidos a partir de 3 medidas para o padrão (n=3) e 5 medidas (n=5) para as amostras, na técnica de HR-CS GF AAS. Logo, quanto menor o desvio padrão e o desvio padrão relativo mais preciso são os resultados. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado a partir da Equação 2.

$$RSD = \frac{\sigma}{\text{média}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

### 4.7.3 Limites de detecção e de quantificação

Limite de detecção (LOD), é a quantidade mínima de massa (ou concentração) do analito que pode ser determinada com um certo grau de certeza estatística. É determinado como três vezes o desvio padrão de dez medidas da solução do branco analítico ou branco analítico, e dividido pela inclinação da curva de calibração, nomeada sensibilidade do método (S), conforme mostrado na Equação 3<sup>74</sup>.

$$LOD = \frac{3\sigma}{S} \quad \text{Equação 3}$$

Limite de quantificação (LOQ), pode ser definido como a menor massa ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente, com um risco de erro inferior que 5%. É determinada como dez vezes o desvio padrão de dez medidas da solução do branco analítico ou branco analítico e dividido sensibilidade (S)<sup>74</sup>. A expressão do LOQ é apresentada na Equação 4.

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 4}$$

Para as medidas da solução do branco, como já mencionado, foram feitas 10 medidas consecutivas do modificador químico: 10 µL de Pd/Mg. A massa de 1,2 mg, que foi o limite máximo de amostra possível de ser analisado na condição 1 e a massa de 0,4 mg nas condições 2 e 3, foram utilizadas para calcular o LOD e LOQ do método analítico, que se dão através da divisão do LOD e LOQ calculados anteriormente pela massa máxima de amostra introduzidas no forno, na análise direta de sólidos.

#### 4.7.4 Massa característica

A massa característica ( $m_0$ ) é a massa necessária para provocar 1% de absorção, ou seja, uma absorvância equivalente a 0,0044 s<sup>47</sup>. A massa característica foi calculada pela razão de 0,0044 s e a sensibilidade do método (S), conforme apresentado na Equação 5.

$$m_0 = \frac{0,0044}{S} \quad \text{Equação 5}$$

## **5. Resultados e discussão**

### **5.1 Estudos prévios**

Primeiramente foi feita uma varredura para verificar a presença de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares e a viabilidade de determinação sequencial e simultânea desses elementos traço. O Cd é o metal mais volátil que o Cr e Fe, de acordo com os relatos da literatura (Boschetti *et al* (2016))<sup>62</sup>. Esses autores realizaram a determinação sequencial e simultânea de Cd, Cr, Fe em amostras de solo, mostrando que foi possível atomizar o Cd completamente sem que o Cr e o Fe sejam volatilizados. Baseado nisso, esta investigação propõe a determinação sequencial e simultânea de Cd, Cr e Fe, na qual, foi realizado a atomização e registro da absorvância do Cd e, em na sequência foi feita a troca de comprimento de onda e aumento da temperatura para atomização e medida, simultânea de Cr e Fe.

Foi explorada a determinação simultânea de Cr e Fe pois, além desses elementos químicos possuem volatilidades semelhantes, apresentam várias linhas atômicas próximas. Assim, a primeira investigação foi avaliar quais linhas analíticas poderiam ser empregadas para a determinação simultânea desses analitos. As concentrações de Cr e Fe nas amostras permitiram o uso da linha principal do Cr, 357,869 nm (com 100% de sensibilidade relativa) e o uso de uma linha alternativa de 358,120nm (1% de sensibilidade relativa) para o Fe; em geral, foi observado, que as amostras de suplementos apresentaram elevadas concentrações de ferro após os estudos prévios.

### **5.2 Avaliação do uso de modificador químico**

Para determinação dos analitos Cr e Fe, segundo a literatura, normalmente, não há necessidade do uso de modificador químico, pois são elementos mais refratários, que atomizam a elevadas temperaturas. Porém, houve a necessidade do emprego de modificador químico para estabilizar o Cd, que é um elemento químico, que volatiliza a baixas temperaturas. Assim, foi feita uma investigação do uso de Pd/Mg e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, como modificadores químicos. A mistura de Pd e Mg foi escolhida por ser considerada um modificador químico

universal. Já o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foi usado baseado nos estudos de Maciel<sup>63</sup>, que investigou diferentes ácidos inorgânicos como modificador químico para melhorar a simetria dos perfis de Cr e Fe em amostras de suplementos. Nesses ensaios, a autora observou que a adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% v/v), comparado com os demais ácidos, resultou em maior simetria nos perfis de pico das amostras mais complexas (como polivitamínicos), bem como, maior precisão e maiores valores de  $A_{\text{int}}$ .

Inicialmente, foi testada a influência da combinação de Pd/Mg nas diferentes amostras usando 10  $\mu\text{L}$  da solução 0,05% Pd+0,03% Mg. Com relação a medida de Cd, as amostras apresentaram sinal, sempre simétrico. Ao longo do estudo observou-se que o Cr e o Fe apresentavam perfis de pico simétricos, exceto para a amostra CE, para a qual se observou pico duplo e caudal e, conseqüentemente, baixa precisão. Além do mais, observou-se que o Pd/Mg modificava o mecanismo de atomização de Cr e Fe.

Quando foi utilizado o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10  $\mu\text{L}$  da solução 1% v/v), obteve-se sinal simétrico para Cd, Cr e Fe nas amostras de WP01 e PV01 e para Cr e Fe na amostra CO01. As amostras CE e IS, que apresentaram sinal para Cd, usando Pd/Mg, não apresentaram sinal na presença de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e apresentaram picos assimétricos para Cr e Fe.

Considerando que a amostra CE apresentou perfis assimétricos, com pico duplo e caudal para Cr e Fe, usando tanto  $\text{H}_2\text{SO}_4$  quanto Pd/Mg, foi realizado o processo de maceração e secagem da mesma, em estufa por 2 horas a 80 °C. Posteriormente, a amostra foi medida novamente, empregando Pd/Mg. No entanto, ainda foi observado falta de reprodutibilidade, bem como assimetria dos picos. Isso sugere que a causa desses problemas não está associada a heterogeneidade das amostras. Então foram feitos novos estudos: secagem do modificador adicionando primeiro o modificador químico Pd/Mg, deixando-o secar e após isso adicionado a amostra na plataforma, introduzido no forno e, então, dado sequência a medida; volumes maiores do modificador químico, mantendo a massa constante (5/3  $\mu\text{g}$ ); concentrações maiores de Pd/Mg (solução 0,1% Pd + 0,06% Mg). Porém, mesmo após essas tentativas, não foi possível obter um resultado satisfatório. Por fim, foi usado gás de purga mínimo, durante a etapa de atomização para Cr e Fe e, com essa estratégia, a falta de

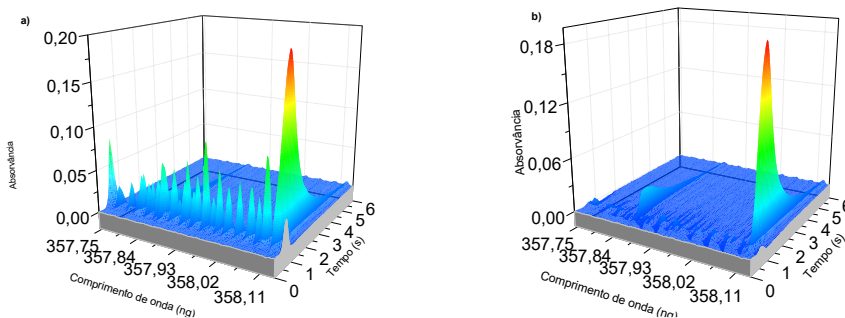
simetria dos picos de Cr e Fe foi resolvida e, conseqüentemente, foi possível corrigir a falta de reprodutibilidade da amostra CE. Com isso, não foram realizados mais testes usando  $H_2SO_4$ , como modificador químico.

Como mencionado anteriormente, a amostra PV01 apresentou bom resultado com os dois modificadores, resultado semelhante ocorreu para PV02, que tem matriz similar à PV01 e apresenta altas concentrações de Cr e Fe. Por conta da elevada concentração desses analitos presentes nessas amostras, mesmo quando aferidas massas pequenas, obtinha-se valores elevados de  $A_{int}$  e perfis de pico caudal. Para contornar esses eventos, também foi adotada a estratégia de usar gás de purga durante a etapa de atomização. O uso de fluxo de gás mínimo para as duas amostras, PV01 e PV02, melhorou a simetria dos picos e a precisão, no entanto, os valores de  $A_{int}$  continuavam elevado. Por fim, foi avaliado o sinal usando as asas do pico (pixels -3 e +3), obtendo-se valores de  $A_{int}$  e precisão satisfatórios para as medidas Cr e Fe nas duas amostras.

Durante esses estudos observou-se interferência espectral na determinação de Cr e Fe na amostra IS, a qual ficava levemente sobreposta ao sinal analítico de ambos os analitos, provocando o aumento dos valores de  $A_{int}$ . A formação dessa molécula estava associada ao Mg presente nessa amostra. A Figura 4 apresenta o espectro antes (a) e após (b) ser resolvido temporalmente para essa amostra.

Afim de averiguar qual molécula era responsável pela interferência, foram testados alguns agentes formadores. Os espectros dessas substâncias foram comparados ao da amostra e identificou-se que a molécula responsável pela interferência era o MgF. Para que a molécula fosse formada nas mesmas condições da amostra, foi adicionado somente  $6 \mu L$  NaF  $1 g L^{-1}$  e  $10 \mu L$  modificador químico Pd/Mg à plataforma e executado o programa de aquecimento. A molécula de referência foi adicionada ao método para que o *software* fizesse a correção usando LSBC, Figura 4 (b).





**Figura 4.** Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança das linhas analíticas de cromo e ferro da amostra IS, com 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg: (a) antes da correção por LSBC e (b) após a correção por LSBC, usando o espectro de referência da molécula MgF.  $T_{\text{pir}}= 700^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cd}}= 1700^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}}= 2600^{\circ}\text{C}$ .

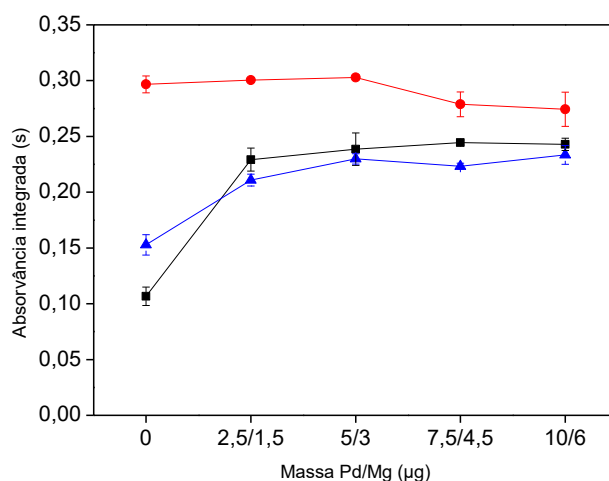
Esses estudos preliminares mostraram que o modificador químico Pd/Mg, combinado ao uso de fluxo de gás durante a atomização, as asas do pico para avaliação dos sinais de Cr e Fe e a correção LBSC, geram resultados satisfatórios, isto é, livres de interferências e precisos. Vale ressaltar que embora o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fosse capaz de resolver o problema de assimetria de perfil de algumas amostras, ele não se mostrou tão eficiente quanto o Pd/Mg na estabilização térmica do Cd. Além disso, seu uso contínuo diminui o tempo de vida da plataforma. Na análise direta de amostras sólidas todos os constituintes da matriz estão presentes no atomizador e, caso não sejam completamente eliminados durante a etapa de pirólise, podem ser uma fonte de interferência espectral<sup>61</sup>.

### 5.3 Estudo da influência da massa do modificador químico

Após definir que a mistura Pd/Mg foi o modificador mais apropriado para essas amostras, foi realizado o estudo de otimização da massa desse modificador com a solução padrão de referência e as amostras PV01 e WP01. A escolha das amostras foi baseada nos perfis de pico e nos teores dos analitos presentes. A PV01 possui mais minerais em sua composição e apresentou elevadas absorvâncias de Cr e Fe, enquanto a WP01 é rica em proteínas e apresentou menores valores de  $A_{\text{int}}$  para os 3 analitos. Os ensaios com a solução padrão de referência de Cd, Cr e Fe foram realizados em triplicata e para as amostras foram feitas 5 medidas. Em ambos os casos, variou-se o volume de

modificador de 0 a 20  $\mu\text{L}$ , o que corresponde a massas de 0 a 10/6  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg, no forno.

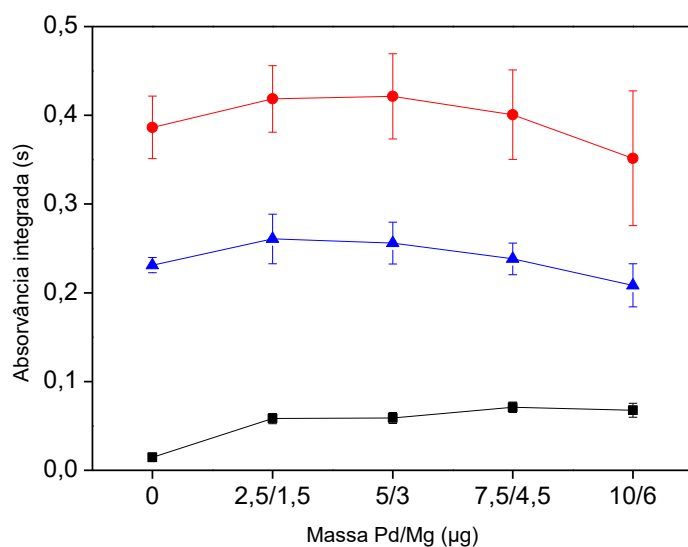
A Figura 5 apresenta a influência do Pd/Mg nos valores de  $A_{\text{int}}$  para o padrão. Os resultados obtidos mostram que para a atomização de Cd e Fe se observa um platô a partir da massa 2,5/1,5  $\mu\text{g}$  Pd/Mg. Já para Cr há uma leve redução do sinal para massas acima de 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg, provocada pela combinação do modificador químico com as características refratárias do Cr, fazendo com que este permaneça adsorvido na plataforma, dificultando a sua completa atomização<sup>47</sup>



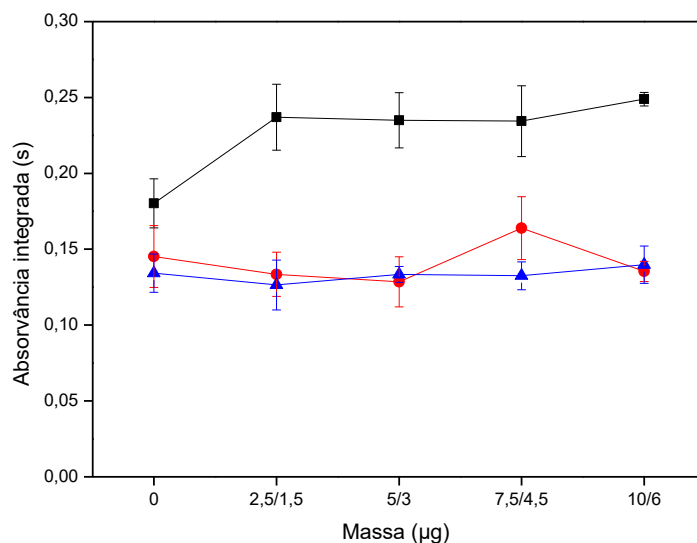
**Figura 5.** Estudo da influência da massa de Pd/Mg no sinal analítico de Cd ( $\blacksquare$ ), Cr ( $\bullet$ ) e Fe ( $\blacktriangle$ ) para solução padrão de referência.  $T_{\text{pir}} = 700$   $^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{atm Cd}} = 1700$   $^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}} = 2600$   $^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 3$ ).

As Figuras 6 e 7 apresentam os estudos de modificador para as amostras WP01 e PV01, respectivamente. O comportamento do Cd, nas duas amostras, foi semelhante ao do padrão, onde há um aumento da absorvância quando se adiciona Pd/Mg e se mantém um patamar em todas as massas avaliadas. A amostra PV01 apresenta um desvio padrão considerável na massa de 7,5/4,5  $\mu\text{g}$ , indicando menor repetibilidade nesse ponto, no entanto, o valor médio de  $A_{\text{int}}$  foi semelhante ao obtido em todas as massas avaliadas de 2,5/1,5 a 10/6  $\mu\text{g}$  de Pd/Mg.

Para as medidas de Cr e Fe, não há mudança significativa sem e com modificador químico, se mantendo um patamar (considerando-se os desvios padrões) dos valores de  $A_{int}$  até a massa máxima de 10/6  $\mu\text{g}$ . Diferente do que ocorre para Cr na solução padrão de referência, quando há perda do sinal analítico a partir da massa de 7,5/4,5  $\mu\text{g}$ , e para o Fe que somente apresenta um patamar a partir da massa de 2,5/1,5  $\mu\text{g}$ .

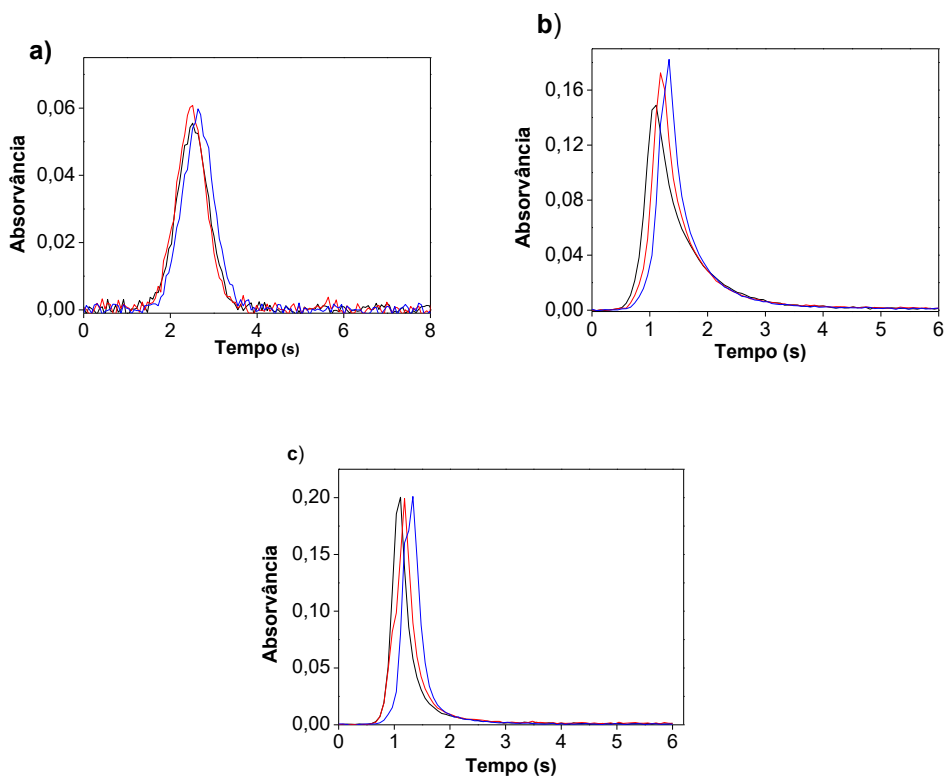


**Figura 6.** Estudo da influência da massa de Pd/Mg no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a amostra WP01. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{atm\ Cr,Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 5$ ).



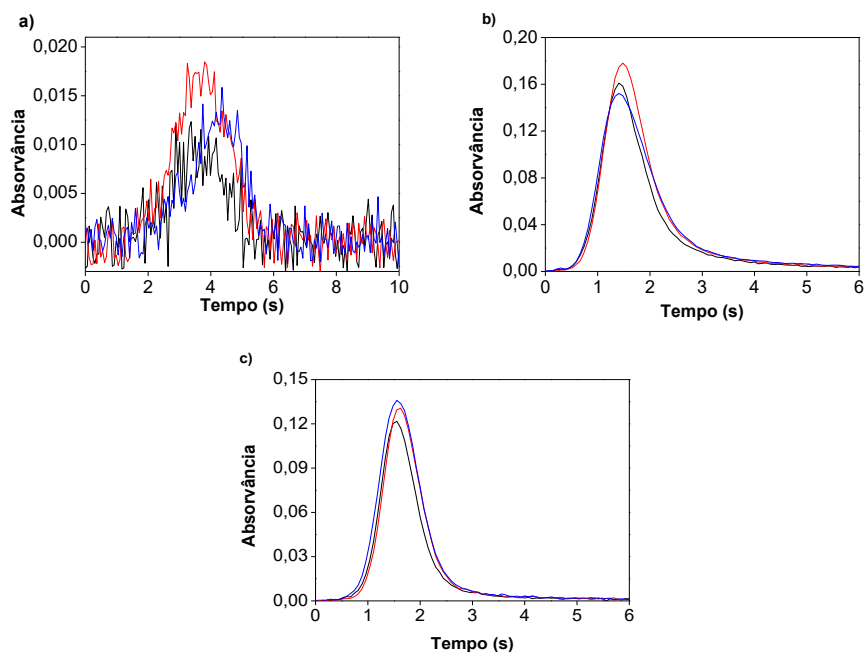
**Figura 7.** Estudo da influência da massa de Pd/Mg no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a amostra PV01. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{atm\ Cr, Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fluxo de  $0,1\text{ L min}^{-1}$  Ar durante a etapa de atomização de Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 5$ ).

Ao avaliar os perfis de pico dos 3 analitos na solução padrão de referência (Figura 8), monitorando as massas de 2,5/1,5 µg à 7,5/4,5 µg, foi possível perceber que são simétricos. Nas Figuras 8 b e c observa-se claramente o retardo no mecanismo de atomização provocado pelo aumento da massa de modificador. Em quantidades crescentes de modificador, os máximos de absorvância se deslocam levemente para tempos maiores. Esses comportamentos são normais e ocorrem devido ao aumento da estabilização dos analitos com o aumento da quantidade de modificador<sup>47</sup> e o leve aumento da altura do pico ocorre por conta do aumento da massa da amostra que foi aferida.

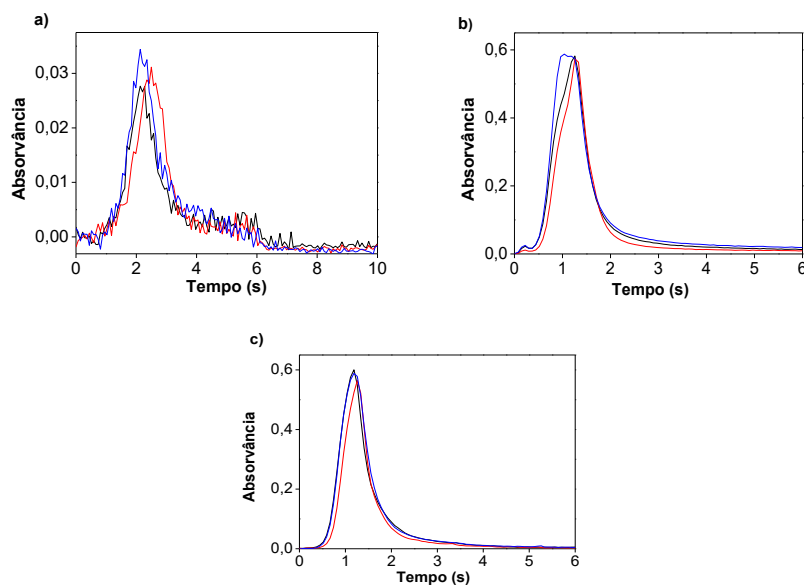


**Figura 8.** Perfis de pico para massas **a)** de 20 pg Cd, **b)** de 0,2 ng Cr e **c)** de 20 ng Fe com a adição de 2,5/1,5 µg (—), 5/3 µg (—) e 7,5/4,5 µg (—) de Pd/Mg.  $T_{\text{pir}} = 700 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{atm Cd}} = 1700 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr, Fe}} = 2600 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As Figuras 9 e 10 apresentam os perfis de pico para as amostras WP01 e PV01, respectivamente. Os perfis do Cd apresentam mais ruído, nas duas figuras, pois este metal está presente em baixa concentração nas duas amostras. Para Cr e Fe tem-se perfis simétricos nas três massas de modificador. Logo qualquer uma dessas massas poderia ser usada para o estudo.



**Figura 9.** Perfis de pico para atomização de: **(a)** Cd, **(b)** Cr e **(c)** Fe para a amostra WP01 com adição de 2,5/1,5 µg (—), 5/3 µg (—) e 7,5/4,5 µg (—) com Pd/Mg.  $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{atm\ Cr,Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

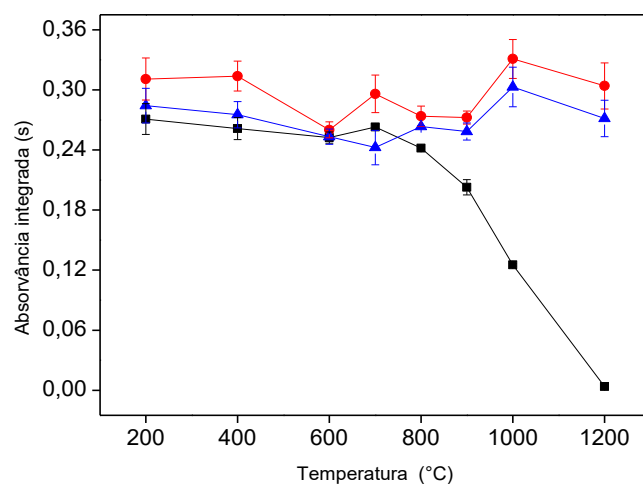


**Figura 10.** Perfis de pico para atomização de: **(a)** Cd, **(b)** Cr e **(c)** Fe para a amostra PV01 com a adição de 2,5/1,5 µg (—), 5/3 µg (—) e 7,5/4,5 µg (—) com Pd/Mg.  $T_{pir} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{atm\ Cd} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{atm\ Cr,Fe} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fluxo de  $0,1\text{ L min}^{-1}$  Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe.

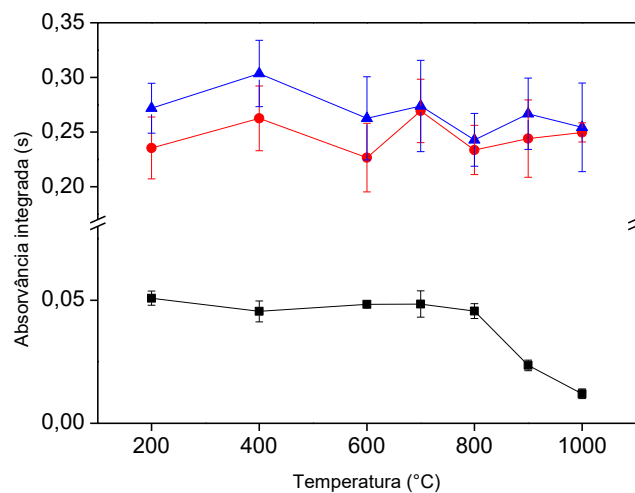
Ao considerar a precisão (Figuras 5, 6 e 7), para as medidas do Cd se observa uma boa repetibilidade para qualquer todas as condições avaliadas, tanto para a solução padrão de referência quanto para as amostras, com maior precisão para massa de 10/6  $\mu\text{g}$ . Já para as medidas do Cr, há uma menor precisão a partir da massa 7,5/4,5  $\mu\text{g}$  na solução padrão de referência e na amostra WP01 que apresenta uma leve diminuição de precisão na massa de 10/6  $\mu\text{g}$ , de acordo com a barra de erro. Para as medidas do Fe, há uma boa repetibilidade para qualquer uma das massas avaliadas no padrão e nas duas amostras. Com isso, as massas 2,5/1,5  $\mu\text{g}$  e 5/3  $\mu\text{g}$  poderiam ser utilizadas. Visando garantir que haja modificador suficiente para interagir com as diferentes massas de amostras introduzidas na plataforma e estabilizar completamente o analito, optou-se por trabalhar com o volume de 10  $\mu\text{L}$  da solução de 0,05% (m/v) Pd + 0,03% (m/v) Mg, que corresponde a massa de 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg. Essa massa de modificador foi empregada em todos os experimentos subsequentes.

#### **5.4 Curvas de pirólise e atomização**

As Figuras 11, 12 e 13 mostram as curvas de pirólise para a solução padrão de referência e para as mesmas amostras de suplemento utilizadas no estudo anterior (WP01 e PV01). Em determinações sequenciais, a etapa de pirólise terá mais impacto no elemento mais volátil, isto é, no que será atomizado primeiro, nesse caso o Cd. Além disso, a etapa de atomização do Cd serve como uma segunda etapa de pirólise para o Cr e Fe. Assim, dificilmente ainda haverá matriz a ser eliminada na etapa de atomização do Cr e o Fe<sup>49</sup>. Os sinais de absorvância de Cr e Fe foram monitorados ao longo da otimização da temperatura de pirólise, e são apresentados nas curvas de pirólise, como forma de garantir e mostrar que não havia interferentes na atomização desses elementos devido a uma incompleta eliminação da matriz, conforme as Figuras (11, 12 e 13).

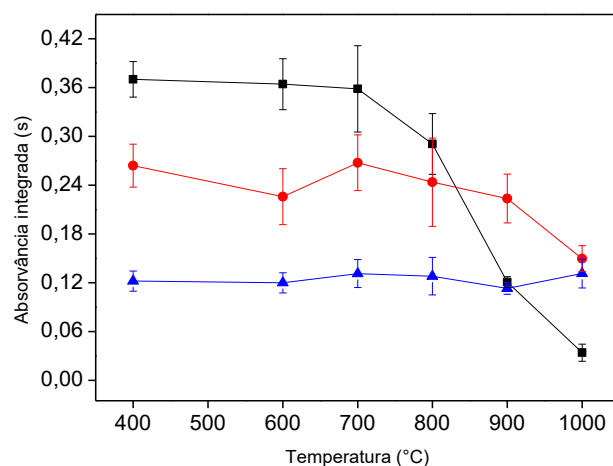


**Figura 11.** Curvas de pirólise para atomização de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a solução padrão de referência, com 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg.  $T_{\text{atm Cd}} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr, Fe}} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 3$ ).



**Figura 12.** Curvas de pirólise para atomização de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para amostra WP01, com 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{\text{atm Cd}} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr, Fe}} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 5$ ).





**Figura 13.** Curvas de pirólise para Cd (■), Cr (●) e Fe (▲) para a amostra PV01, com 5/3 µg Pd/Mg. Massa da amostra foi normalizada para 0,2 mg.  $T_{atm\ Cd} = 1700$  °C para e  $T_{atm\ Cr,Fe} = 2600$  °C e fluxo de  $0,1\ L\ min^{-1}$  Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 5).

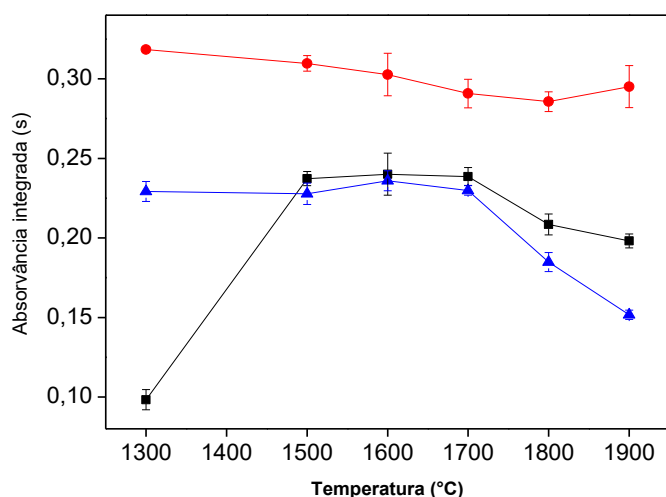
Observando-se o comportamento da curva de pirólise para Cd (Figuras 11 - 13), tem-se um patamar até 700 °C para a solução padrão de referência e para a amostra PV01. A amostra WP01 apresenta patamar até 800°C. Essa relativa maior estabilidade térmica da amostra ocorre porque algum componente da própria matriz da amostra estabiliza termicamente o Cd a temperaturas de pirólise acima daquelas da solução padrão aquosa. Qualquer uma das temperaturas do patamar poderia ser empregada, porém em temperaturas de pirólise mais baixas (200 °C) havia presença de fumaça no início da atomização do Cd para as amostras PV01 e WP01, o que provocou o espalhamento da radiação. Isso mostra que essa temperatura de pirólise não era capaz de eliminar completamente a matriz<sup>49</sup>. Justamente por isso, a amostra PV01 não pôde ser medida utilizando a temperatura de pirólise de 200 °C. Logo, qualquer uma dessas temperaturas do intervalo de 400 à 700 °C poderia ser utilizada para a pirólise, no entanto a temperatura de 700 °C foi escolhida como a ideal para garantir a completa eliminação da matriz das diferentes amostras de suplemento. Esta temperatura está de acordo com a estabelecida no trabalho de Leão *et al*<sup>64</sup> na determinação simultânea de cádmio, ferro e estanho em alimentos enlatados,

usando a linha primária (228,802 nm) para cádmio e as linhas secundárias adjacentes (228,725 nm e 228,668 nm) para ferro e estanho, respectivamente.

É importante salientar que na amostra PV01 havia presença de uma molécula nas vizinhanças da linha analítica do Cd em todas as temperaturas estudadas. Porém, a mesma não se sobrepunha ao sinal analítico, ou seja, não interferia no valor de  $A_{int}$ , logo era possível determinar Cd com a presença da molécula.

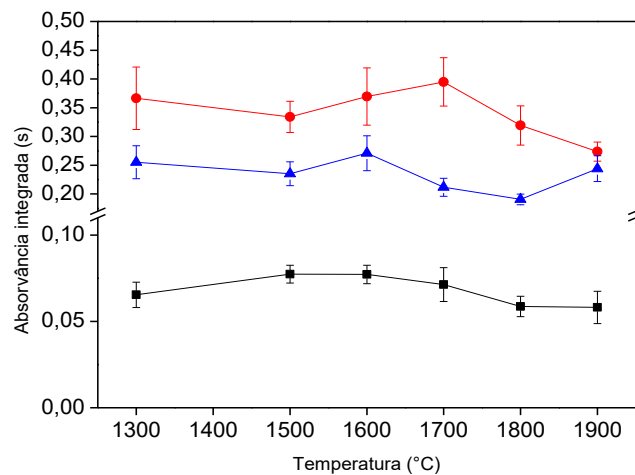
Após estabelecer a temperatura ótima de pirólise, foram construídas as curvas de atomização de Cd, Cr e Fe para as mesmas amostras e a solução padrão de referência. Como o Cd é o elemento mais volátil e o primeiro a ser atomizado, iniciou-se os estudos de atomização por ele.

Na Figura 14 tem-se a curva de atomização para Cd a partir da solução padrão de referência. Observa-se que o valor de  $A_{int}$  de Cd se mantém constante entre 1500 e 1700 °C, mas acima dessas temperaturas (1800 e 1900 °C), ocorre uma diminuição no sinal analítico devido ao aumento da velocidade de difusão do Cd, para o exterior do forno, devido às elevadas temperaturas<sup>49</sup>. Nas temperaturas de 1600 e 1700 °C, são obtidos perfis simétricos, sendo que em 1700 °C se tem melhor precisão em relação às outras temperaturas.

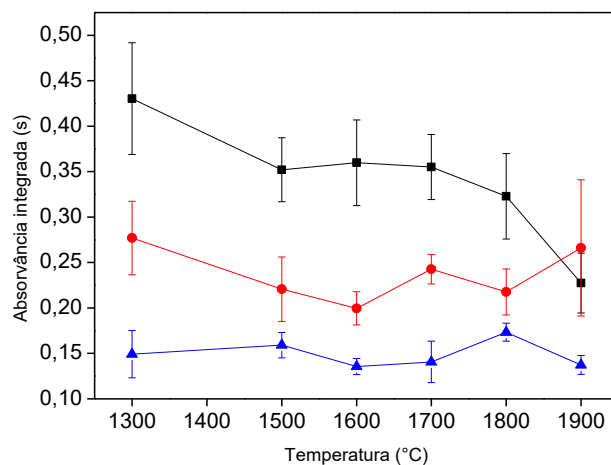


**Figura 14.** Curva de atomização para Cd (■) para a solução padrão de referência, com 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg.  $T_{\text{pir}} = 700$  °C e  $T_{\text{atm Cr,Fe}} = 2600$  °C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 3$ ).

Nas amostras WP01 e PV01 (Figuras 15 e 16), foi observado um comportamento diferente da solução padrão de referência: o Cd foi completamente atomizado a partir de 1300 °C em ambas as amostras. Para a amostra PV01, o valor de  $A_{\text{int}}$  em 1300 °C foi maior do que para as demais temperaturas avaliadas, provavelmente, pelo pico ser mais alargado. Além disso, observou que na WP01 o sinal se mantém constante até 1900 °C (considerando as barras de erro), enquanto na PV01 há um platô até 1800 °C, seguido de uma diminuição do sinal. Apesar da diferença inicial entre as curvas das amostras e da solução padrão de referência, em temperaturas mais elevadas (acima de 1500 °C), o comportamento foi semelhante, apresentando um platô até 1700 °C. Avaliando-se o comportamento das curvas de atomização para Cr e Fe, nas Figuras 15-16, percebe-se que os valores de  $A_{\text{int}}$  desses elementos químicos permanecem dentro de um patamar pelo menos até 1700 °C. Com base nessas informações, conclui-se que a temperatura de 1700 °C foi adequada para as duas amostras e para a solução padrão de referência, pois permite a atomização completa do analito e um perfil de pico mais simétrico. Além disso, nessa temperatura tem-se uma boa precisão.



**Figura 15.** Curva de atomização para Cd (■) para a amostra WP01, com 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{\text{pir}} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  para Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 5$ ).



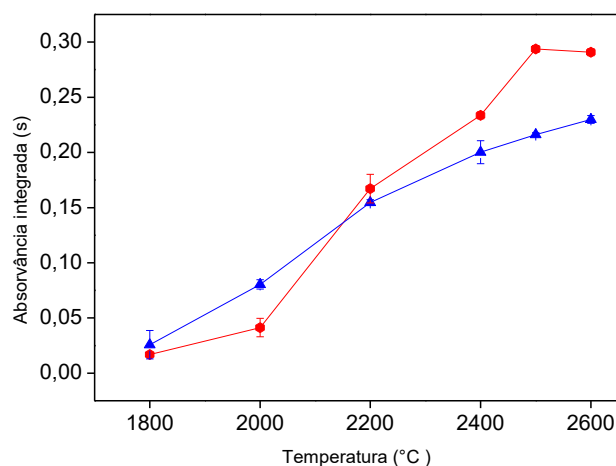
**Figura 16.** Curva de atomização para Cd (■) para a amostra PV01, com 5/3  $\mu\text{g}$  Pd/Mg. Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{\text{pir}} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fluxo de  $0,1\text{ L min}^{-1}$  Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 5$ ).

Após estabelecidas as temperaturas de pirólise e de atomização do Cd, foram otimizadas as temperaturas de atomização do Cr e Fe. A partir das Figuras 17 e 18, observa-se que a  $1800\text{ }^{\circ}\text{C}$ , praticamente, não ocorre a atomização de Cr e Fe, o que já era esperado, considerando que são elementos refratários e,

portanto, precisam de alta temperatura para uma atomização satisfatória<sup>47</sup>. Por esse motivo, a curva de atomização da amostra PV01 (Figura 19) inicia somente em 2000 °C. Além disso, essa observação corrobora com o observado anteriormente nas curvas de atomização do Cd (Figuras 14-16), de que os sinais de absorvância de Cr e Fe se mantêm constante até pelo menos 1700 °C.

Nas temperaturas de atomização de 2000 e 2200 °C, o tempo de atomização e integração, inicialmente foram fixados em 6 segundos, sendo insuficientes para registrar todo o processo de atomização, até o retorno para linha de base. Mesmo com o aumento desse tempo para 10 segundos, a atomização e integração dos sinais de Cr e Fe foi incompleta. Conseqüentemente, temperaturas maiores precisaram ser empregadas para que os analitos fossem completamente atomizados e tempos de integração menores pudessem ser adotados<sup>47</sup>. É importante considerar que aumentar muito o tempo de atomização não é recomendado, uma vez que isso resulta em uma diminuição do tempo de vida útil do forno e da plataforma.

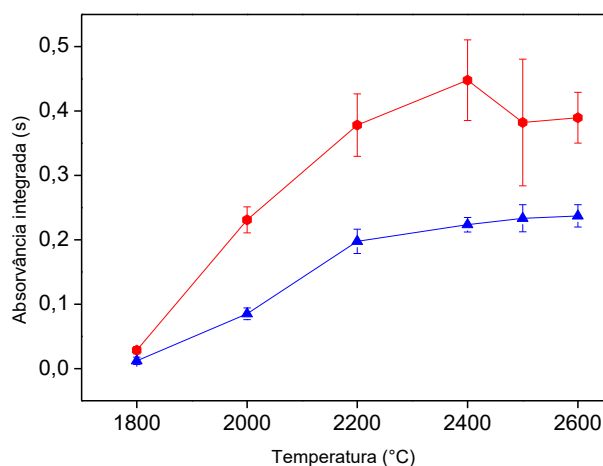
Na solução padrão de referência, entre as temperaturas de 2000 e 2500 °C, houve um aumento gradativo do sinal analítico ( $A_{int}$ ). A partir de 2500 °C, o sinal analítico para o Cr permaneceu estável, mantendo um patamar entre 2500 e 2600 °C. Por outro lado, para o elemento Fe, houve um aumento contínuo do sinal analítico mesmo após 2600 °C. No entanto, temperaturas mais elevadas não foram avaliadas, devido à preservação do forno. Além do mais, na temperatura de atomização de 2600 °C, foi observado que os perfis de pico eram mais simétricos e os valores de  $A_{int}$  eram maiores em comparação com as outras temperaturas estudadas. Assim, a temperatura de 2600 °C resultou em uma resposta analítica mais sensível e precisa para os elementos químicos.



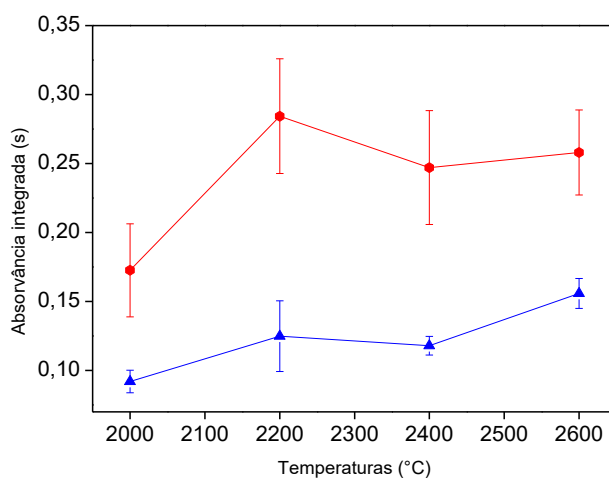
**Figura 17.** Curva de atomização para Cr (●) e Fe (▲) para a solução padrão de referência, com 5/3  $\mu\text{g Pd/Mg}$ .  $T_{\text{pir}} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm}} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  para Cd. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 3$ ).

Para as amostras WP01 (Figura 18) e PV01 (Figura 19), houve um comportamento semelhante ao da solução padrão de referência: um aumento gradativo do sinal analítico ( $A_{\text{int}}$ ) a partir de  $2000\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No entanto, os patamares, ocorreram em faixas de temperatura diferentes em comparação ao padrão. O patamar ocorre entre  $2200$  e  $2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  para o Cr e Fe em ambas as amostras (considerando o desvio padrão). Portanto, a temperatura de  $2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi considerada a temperatura ótima de atomização para esses elementos químicos (Cr e Fe), pois nessa temperatura se obteve um sinal analítico mais reprodutível e perfis de pico mais simétricos. Essa temperatura ótima foi semelhante à encontrada em um trabalho anterior de Boschetti *et al.* (2016)<sup>65</sup> para a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de solo.

É importante ressaltar que para a amostra PV01 foi necessário empregar fluxo de gás durante a etapa de atomização, devido as altas concentrações de Cr e Fe nessa amostra. O fluxo de gás auxiliou na melhora do perfil dos sinais analíticos, eliminou o efeito de memória melhorando, conseqüentemente, a precisão.



**Figura 18.** Curva de atomização para Cr (●) e Fe (▲) para a amostra WP01, com 5/3  $\mu\text{g Pd/Mg}$ ). Massa da amostra normalizada para 0,2 mg.  $T_{\text{pir}} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cd}} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 5$ ).



**Figura 19.** Curva de atomização para Cr (●) e Fe (▲) para a amostra PV01, com 5/3  $\mu\text{g Pd/Mg}$ . Massa normalizada para 0,2 mg.  $T_{\text{pir}} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cd}} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fluxo de  $0,1\text{ L min}^{-1}$  Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ( $n = 5$ ).

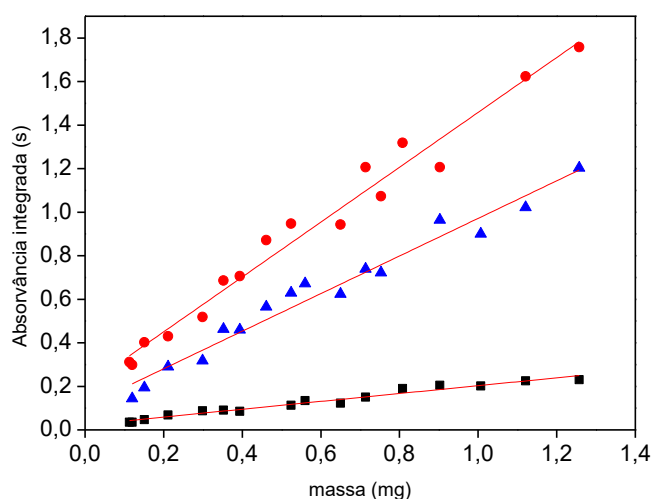
As temperaturas de atomização ótimas de  $1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  para a determinação simultânea de Cd e Fe estão de acordo com as temperaturas mencionadas nos trabalhos de Dos Santos *et al*<sup>66-67</sup> para a determinação simultânea desses elementos químicos em feijões e solos e em produtos de

grãos. A similaridade nas temperaturas ótimas de atomização indica que essas temperaturas são adequadas para a determinação precisa e simultânea de Cd e Fe em diferentes tipos de amostras.

### 5.5 Estudo da influência da massa de amostra

O estudo da influência da massa da amostra foi feito com as mesmas amostras usadas na otimização das demais condições do método. No caso, na WP01, foram avaliadas massas de 0,100 a 1,250 mg e para a PV01 de 0,02 a 0,70 mg.

Ao avaliar a Figura 20, observa-se que massas entre 0,100 e 1,250 mg da amostra WP01 apresentam resposta linear, com coeficientes de correlação ( $r$ ) para Cd, Cr e Fe de 0,9702, 0,9748 e 0,9678, respectivamente indicando uma forte correlação. Deve-se ressaltar que não houve variação significativa do perfil do pico à medida que se aumentava a massa da amostra, logo, qualquer massa aferida dentro dessa faixa poderia ser utilizada. Apesar dos valores de  $A_{int}$  de Cr e Fe aumentarem gradativamente de acordo com o aumento da massa da amostra, ainda assim tem-se uma resposta analítica linear.

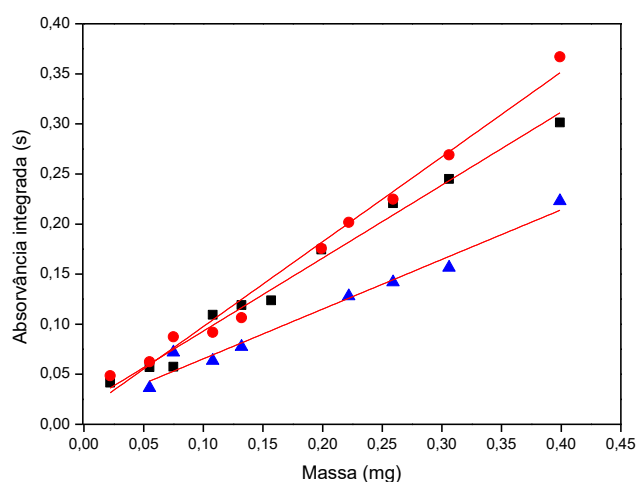


**Figura 20.** Influência da massa de amostra para WP01 no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲), com 5/3  $\mu\text{g Pd/Mg}$ .  $T_{pir}= 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{atm\ Cd}= 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{atm\ Cr,Fe}= 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Na análise da amostra PV01 (Figura 21), devido às elevadas concentrações de Cr e Fe, mesmo empregando fluxo de gás mínimo na atomização, a massa utilizada foi limitada pelos valores de  $A_{int}$  desses analitos. Foram avaliadas massas entre 0,022 e 0,700 mg para as medidas das absorvâncias de Cd, Cr e Fe. No entanto, observou-se que para massas acima de 0,400 mg os picos eram mais caudais e a resposta analítica não era satisfatória, com sinais inferiores aos esperados. Por isso, os gráficos da Figura 21 só mostram os resultados até a massa de 0,400 mg. Nesse intervalo de massa, foram obtidos coeficientes de correlação ( $r$ ) de 0,9871, 0,9868 e 0,9747 para Cd, Cr e Fe, respectivamente, indicando uma forte correlação entre a massa de amostra e o sinal analítico. Além disso, não foi observado desvio de linearidade nesse intervalo de massa. Com base nisso, foi recomendado utilizar massas entre 0,022 e 0,400 mg para garantir uma resposta analítica confiável para os elementos químicos Cd, Cr e Fe na amostra PV01, considerando os valores de  $A_{int}$ , os coeficientes de correlação e a linearidade das respostas.

Com bases nesses resultados, para matrizes com características mais orgânicas, como a WP01, foram usadas massas de até 1,250 mg – a depender também dos sinais dos analitos, garantindo que ficassem dentro da faixa de trabalho e para amostras com matrizes mais minerais, como a PV01, foram usadas massas de até 0,400 mg.



**Figura 21.** Influência da massa de amostra para PV01 no sinal analítico de Cd (■), Cr (●) e Fe (▲), com 5/3  $\mu\text{g Pd/Mg}$ .  $T_{\text{pir}} = 700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{atm Cd}} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm Cr,Fe}} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fluxo de  $0,1\text{ L min}^{-1}$  Ar durante a etapa de atomização para Cr e Fe.

## 5.6 Parâmetros de mérito

Todas as curvas de calibração foram construídas a partir de soluções padrão aquosas. Para a técnica de HR-CS GF AAS foram empregadas soluções multielementares. Devido à grande variação das concentrações dos analitos nas amostras avaliadas, foram usadas diferentes condições para a construção das curvas de calibração e quantificação das amostras, que foram identificadas como condições 1, 2 e 3, apresentadas na Tabela 3. A Tabela 9 apresenta as equações de regressão linear, os coeficientes de correlação ( $r$ ), LOD, LOQ e  $m_0$  para essas condições experimentais. Os parâmetros LOD, LOQ e  $m_0$  foram calculados usando as Equações 3, 4 e 5, respectivamente. Os valores de LOD e LOQ, em concentração foram calculados considerando a massa máxima de amostra inserida no forno de grafite, de 1,250 mg para condição 1 e de 0,400 mg nas condições 2 e 3.

**Tabela 9.** Parâmetros de mérito obtidos para Cd, Cr e Fe utilizando diferentes condições experimentais *via* HR-CS GF AAS e a análise direta de amostras sólidas.

Condição	Analito	Equação de Regressão Linear	r	LOD (pg)	LOQ (pg)	LOD* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$m_0$ (pg)
1	Cd	$A_{int} = 5,27 \cdot 10^{-3} m \text{ (pg)} + 1,73 \cdot 10^{-2}$	0,997	2,34	7,79	1,95	6,49	0,84
	Cr	$A_{int} = 9,53 \cdot 10^{-4} m \text{ (pg)} + 1,63 \cdot 10^{-2}$	0,998	5,80	19,3	4,83	16,1	4,62
	Fe	$A_{int} = 8,47 \cdot 10^{-3} m \text{ (ng)} + 1,25 \cdot 10^{-2}$	0,996	0,89 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a</sup>	0,74 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>	0,52 <sup>b</sup>
2	Cd	$A_{int} = 2,71 \cdot 10^{-3} m \text{ (pg)} + 7,13 \cdot 10^{-3}$	0,992	2,73	9,11	6,83	22,8	1,62
	Cr	$A_{int} = 7,00 \cdot 10^{-4} m \text{ (pg)} - 4,67 \cdot 10^{-4}$	0,996	11,3	37,6	28,2	93,9	6,28
	Fe	$A_{int} = 4,22 \cdot 10^{-3} m \text{ (ng)} + 7,82 \cdot 10^{-3}$	0,994	3,08 <sup>a</sup>	10,3 <sup>a</sup>	7,69 <sup>a</sup>	25,6 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>
3	Cr	$A_{int} = 3,76 \cdot 10^{-5} m \text{ (pg)} - 2,42 \cdot 10^{-3}$	0,995	45,6	152	114	380	117
	Fe	$A_{int} = 1,67 \cdot 10^{-4} m \text{ (ng)} + 1,95 \cdot 10^{-2}$	0,996	12,0 <sup>a</sup>	39,9 <sup>a</sup>	29,9 <sup>a</sup>	99,7 <sup>a</sup>	26,3 <sup>b</sup>

\*Calculados para uma massa da amostra de 1,250 mg na condição 1 e 0,400 mg para nas condições 2 e 3.

<sup>a</sup>mg kg<sup>-1</sup>, <sup>b</sup>ng

Os valores de  $r$  obtidos a partir das curvas de calibração mostram uma correlação forte existente entre valores de  $A_{\text{int}}$  e as massa de analitos, indicando a boa linearidade das curvas<sup>72</sup>.

As variações dos valores de LOD, LOQ e  $m_0$  das condições 1, 2 e 3 mostram a influência da presença de fluxo de gás mínimo na etapa de atomização e dos *pixels* escolhidos para avaliação do sinal na sensibilidade do método. Observa-se que a condição 1 foi a de maior sensibilidade, o que é perceptível através dos valores de LOD, LOQ e  $m_0$ . Os valores de  $m_0$  estão concordantes com os valores reportados pelo fabricante do instrumento para Cd e Cr, e com algumas referências reportadas na literatura; o fabricante não reporta a  $m_0$  para a linha de Fe usada.

Na condição 1 não foi possível quantificar amostras com elevada concentração de Cr e Fe, pois os sinais desses analitos estavam fora da faixa de trabalho. As condições 2 e 3 utilizaram fluxo de gás mínimo na etapa de atomização e, na condição 3 ainda foram monitorados os *pixels* laterais (-3 e +3). Através dos resultados da Tabela 9 observou-se que, quando avaliado o *pixel* central e os *pixels* adjacentes ( $CP_{\pm 1}$ ), há uma maior sensibilidade do que quando os *pixels* avaliados são mais distantes do *pixel* central. Isto já era esperado pois a medida de absorvância das asas do pico acarreta numa diminuição significativa da sensibilidade do método analítico. Essa abordagem expande a faixa de trabalho, tornando possível a quantificação de amostras com maiores teores de analito, como reportado por Welz *et al*<sup>69</sup>.

As massas características da condição 1 desse trabalho foram comparadas com dados da literatura. O valor de  $m_0$  de Cd foi similar ao reportado por Dos Santo *et al*<sup>66</sup> na determinação simultânea de Cd e Fe, cuja  $m_0$  obtida foi de 0,7 pg para Cd. Os resultados de Cr e Fe foram comparados com os de Dittert *et al*<sup>68</sup>. (2009), que fizeram a determinação simultânea de Cr e Fe em petróleo bruto, usando as mesmas linhas analíticas desse trabalho. Os valores obtidos por esses autores foram 0,5 ng para Fe e 3,6 pg para Cr, estando semelhantes aos valores apresentados na Tabela 9. Os resultados obtidos para  $m_0$ ,

empregando as condições 2 e 3 não podem ser comparados com a literatura, haja visto que tais condições experimentais ainda não foram reportadas em outros trabalhos.

É importante mencionar que o LOQ para determinação de Cd, na condição 1, de  $6,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , está bem abaixo do limite máximo de Cd estabelecido pela Farmacopeia Brasileira, que é de  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ <sup>12</sup> para ingredientes usados na fabricação dos suplementos alimentares. Isso indica que o método analítico otimizado foi capaz de detectar níveis baixos de cádmio e está em conformidade com os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira. Portanto, o método analítico é adequado para a determinação de Cd em suplementos alimentares.

Para os suplementos que são desenvolvidos e comercializados como fontes de Cr e Fe, a análise química tem por objetivo verificar a conformidade entre o teor encontrado e o declarado nos rótulos. Considerando que estes metais estão presentes em elevadas concentrações, espera-se que não haja maiores problemas relacionados a sensibilidade do método analítico proposto.

Para mostrar isso, os valores de LOD e LOQ para determinação de Cr foram avaliados considerando o limite mínimo recomendado pela IN Nº 102, de 15 de outubro de 2021 da ANVISA e a dose diária de suplemento recomendada pelo fabricante. Por exemplo, a dose diária recomendada para o suplemento CO02 é de 10 g e o limite mínimo de Cr estabelecido pela legislação é de  $5,25 \mu\text{g}$ , então a concentração mínima de cromo encontrada na amostra seria de  $525 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Com base nesse exemplo conclui-se que os valores de LOD e LOQ para determinação de Cr são significativamente menores do que a concentração mínima exigida pela legislação vigente. Isso indica que o método analítico foi capaz de detectar e quantificar a concentração de Cr em níveis baixos, obedecendo os limites estabelecidos pela Instrução Normativa da ANVISA<sup>11</sup>. Isso evidencia que o método analítico, é adequado e atende aos requisitos da legislação vigente em relação à determinação de cromo em suplementos alimentares.

A IN N<sup>o</sup> 102, de 15 de outubro de 2021 estabelece o limite mínimo de 2,7 mg de ferro, valor bastante elevado e que pode ser facilmente determinado pela técnica de HR-CS GF AAS<sup>57</sup>. Nesse caso, o maior desafio é alcançar uma condição de menor sensibilidade para que o limite superior da faixa de trabalho não seja excedido. Com um ajuste das condições instrumentais da técnica de HR-CS GF AAS (uso de fluxo de gás na atomização e *pixels* laterais para avaliação do sinal), foi possível alcançar a sensibilidade adequada para a determinação de ferro nos suplementos alimentares de forma confiável, garantindo que os resultados permanecessem dentro da faixa de trabalho, atendendo os requisitos da legislação estabelecidos pela ANVISA<sup>11</sup>.

### 5.6.1 Exatidão

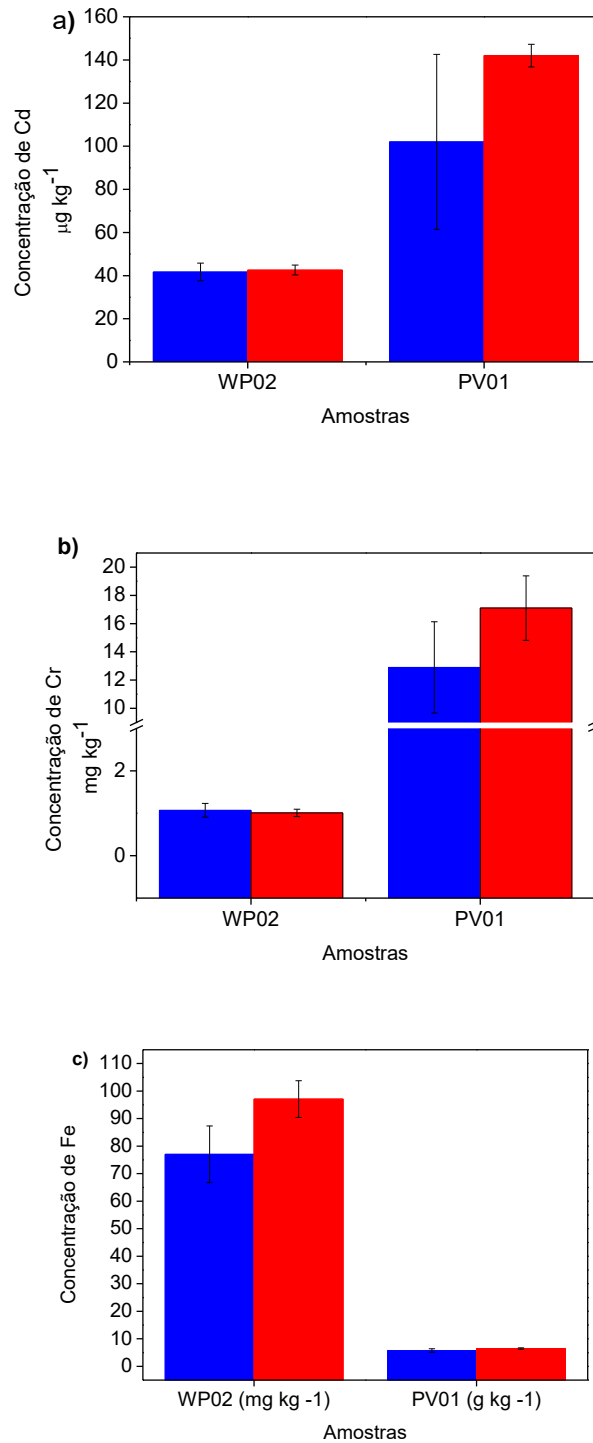
Primeiramente, a exatidão do método analítico foi avaliada analisando o material de referência certificado de folhas de tomateiro (*Tomate Leaves*, SRM NIST 1573a) empregando a condição 2 para Cd e a condição 1 para Cr e Fe, de maneira a garantir que os valores de  $A_{int}$  dos 3 analitos ficassem dentro da faixa de trabalho. Os valores certificados e encontrados estão apresentados na Tabela 10. Eles foram comparados entre si através do teste *t-Student*, a um nível de confiança de 95%, considerando o valor certificado como valor verdadeiro. Os valores de  $t$  calculados também são apresentados na Tabela 10. O valor de  $t_{crítico}$  para 3 graus de liberdade e 95% de confiança é de 3,28. Comparando-se os valores de  $t_{calculado}$ , observou-se, que são menores do que  $t_{crítico}$ . Logo, concluiu-se que as concentrações de Cd, Cr e Fe encontradas não apresentam diferença significativa aos valores certificados, possibilitando afirmar que o método analítico proposto foi exato.

**Tabela 10.** Concentrações de Cd, Fe e Cr no SRM de folha de tomate (NIST 1573a, *Tomate Leaves*) por HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos. Resultado expresso como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).

<b>NIST SRM 1573a</b>	<b>Cd (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cr (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fe (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
Valores certificados	1,520 $\pm$ 0,040	1,990 $\pm$ 0,060	368 $\pm$ 7
Valores encontrados	1,439 $\pm$ 0,087	2,287 $\pm$ 0,336	421 $\pm$ 73
t <sub>calculado</sub>	1,08	1,45	1,46

Considerando que o SRM utilizado apresentava uma matriz diferente das amostras, a exatidão do método também foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com aqueles do método de digestão ácida assistida por micro-ondas (MW-AD). Duas amostras de suplementos alimentares foram analisadas pelo método de digestão ácida (WP02 e PV01) e quantificadas por LS-GF AAS, utilizando as condições estabelecidas pelo fabricante do espectrômetro. Considerando que os valores de LOD e LOQ obtidos na técnica de LS-GF AAS são maiores – principalmente devido a diluição da amostra no processo de preparo – foram escolhidas amostras que apresentaram sinais mais elevados de absorvância de Cd no estudo preliminar.

Para avaliar a semelhança dos resultados, calculou-se o intervalo de confiança para cada analito, em cada amostra, para um nível de confiança de 95%. Eles são apresentados na forma de barras de erros nas Figuras 22 a, b e c. Avaliando os gráficos da Figura 22 (a, b e c), levando em consideração os intervalos de confiança calculados, foi possível concluir que os resultados dos dois métodos, digestão e análise direta, são estatisticamente iguais para as duas amostras avaliadas: WP02 e PV01.



**Figura 22.** Comparação das concentrações de a) Cd, b) Cr e c) Fe, obtidas por análise direta por HR-CS-GF AAS (barras azuis) e LS-GF AAS, após MW-AD (barras vermelhas). Resultados expressos com média  $\pm$  intervalo de confiança (n= 5).



### *5.6.2 Aplicação do método e análise de rotulagem*

Após a definição dos parâmetros analíticos e avaliação da exatidão, o método analítico foi aplicado às amostras de suplementos alimentares. A Tabela 11 apresenta as concentrações de Cd, Cr e Fe, juntamente com o desvio padrão e o desvio padrão relativo (RSD). A depender da concentração dos analitos nas amostras, foram empregadas a condição 1, 2 ou 3 para a análise, utilizando a curva de calibração obtida na mesma condição (1, 2 ou 3) para a quantificação.

**Tabela 11.** Concentrações de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares quantificadas por HR-CS GF AAS (n = 5).  
 A depender da concentração dos analitos nas amostras, foram empregadas a condição 1, 2 ou 3 para a análise.

Amostras	Cádmio		Cromo		Ferro	
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	RSD	$\text{mg kg}^{-1}$	RSD	$\text{mg kg}^{-1}$	RSD
<b>WP01</b>	33,3 ± 3,0	9,0%	1,82 ± 0,18	10%	138 ± 12	8,7%
<b>WP02</b>	41,7 ± 3,3	7,9%	1,07 ± 0,13	12%	77,0 ± 8,3	11%
<b>CE01</b>	<LOQ	n.d.	0,63 ± 0,13	21%	275 ± 36	13%
<b>CO01</b>	<LOQ	n.d.	0,50 ± 0,03	6,0%	20,8 ± 2,5	12%
<b>CO02</b>	<LOD	n.d.	0,80 ± 0,10	13%	<LOQ	n.d.
<b>IS</b>	<LOQ	n.d.	0,28 ± 0,02	7,1%	142 ± 19	13%
<b>PV01</b>	102 ± 33	32%	12,9 ± 2,6	20%	5,72 ± 0,66*	12%
<b>PV02</b>	121 ± 16	13%	17,6 ± 0,3	1,7%	2,99 ± 0,26*	8,7%
<b>PV03</b>	90,0 ± 34,3	38%	4,68 ± 0,73	16%	16,5 ± 2,4*	15%
<b>VD</b>	<LOD	n.d.	15,9 ± 2,2	14%	6,97 ± 0,50*	7,2%

\*Valores de concentração em  $\text{g kg}^{-1}$ ; n.d. = não determinado.

### 5.6.2.1 Precisão

A partir dos dados de RSD apresentados na Tabela 11, foi avaliada a precisão do método analítico. Vários fatores corroboram para o aumento de RSD na análise direta de sólidos como: a pequena massa utilizada para análise (alíquota pouco representativa), a forma como as amostras são comercializadas e as condições instrumentais empregadas na análise<sup>46</sup>. Por esses motivos, valores de RSD mais altos, de cerca de 20 % são aceitáveis quando se trabalha com a análise direta de amostras sólidas<sup>70</sup>.

Como pode ser visto na Tabela 11, apenas os resultados de Cd das amostras PV01 e PV03 excederam esses valores de cerca de 20 %, o que pode estar relacionado às características dessas amostras e a baixa concentração de Cd presente. A amostra PV03 é comercializada na forma de comprimido e durante a moagem dessa amostra observou-se que o revestimento do comprimido não foi completamente triturado, resultando em fragmentos rosados dispersos num pó fino amarelo claro. A partir disso, essa amostra foi peneirada, separando os fragmentos rosados (de maior tamanho), em seguida, as duas frações foram analisadas; houve uma maior reprodutibilidade nos resultados da fração que passou pela peneira. Porém, observou-se que as concentrações de Cd e Fe diminuíram consideravelmente na fração que passou pela peneira, sugerindo que o revestimento do comprimido continha uma quantidade significativa desses analitos. Esses dados não são apresentados na Tabela 11, pois não representam a concentração real do analito na amostra. Isso mostra a importância de analisar a amostra na íntegra, apesar da sua heterogeneidade e seus efeitos na precisão do resultado<sup>73</sup>. Já a PV01 é comercializada na forma de cápsula e por se encontrar na forma de pó fino não foi submetida ao procedimento de moagem, o que pode ter contribuído para a falta de distribuição uniforme dos analitos na amostra. O único pré-tratamento realizado foi a abertura da cápsula para acessar o pó.

Essas diferenças na forma como as amostras são apresentadas e preparadas podem introduzir variabilidades adicionais no processo analítico,

afetando a precisão dos resultados, mas, conforme já discutido acima, não afetaram a exatidão.

Outro fator que contribuiu para o aumento do valor do RSD foram as condições instrumentais usadas para analisar as amostras com maiores concentrações de Cr e Fe. Foram observados maiores valores de RSD para aquelas amostras analisadas nas condições 2 ou 3, nas quais se emprega fluxo de gás mínimo e/ou são monitoradas as asas -3/+3. Esse comportamento também foi observado para as soluções padrão de referência. Observou-se, ao longo das medidas, que o fluxo de gás durante a atomização deixa o sinal mais ruidoso. Além disso, os *pixels* laterais têm sua absorvância mais afetada pelas oscilações dos perfis dos sinais, além de apresentarem menores valores de absorvância, o que diminui a razão S/N<sup>56</sup>.

#### *5.6.2.2 Comparação das concentrações de Cd, Cr e Fe com a legislação*

Tendo em vista que a Instrução normativa não estabelece limite máximo para contaminantes, o estudo comparou os valores de Cd encontrados nas amostras (Tabela 11) com os valores estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, que define um limite máximo de 500 µg kg<sup>-1</sup> para o cádmio em suplementos. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de Cd abaixo do limite permitido pela legislação<sup>12</sup>. No entanto, embora as concentrações de Cd estejam abaixo do estipulado, ele está presente como contaminante. Ao considerar a dose diária de Cd nos suplementos, os resultados indicaram que a quantidade de Cd consumida através dos polivitamínicos era de 0,1 µg por dose diária<sup>-1</sup>. As amostras WP01 e WP02 apresentaram concentrações um pouco mais elevadas, com valores de 1,2 µg (ou 2,3 µg para 2 doses) e 1,5 µg de Cd por dose diária<sup>-1</sup>, respectivamente. Conforme já mencionado anteriormente, o Cd é um elemento potencialmente tóxico e a exposição a longo prazo pode ser prejudicial à saúde<sup>13-14-15</sup>.

Para avaliar se os teores de Cr e Fe nas amostras estão concordantes com a legislação, os resultados da Tabela 11 foram usados para calcular a quantidade de Cr e Fe presente em uma dose de suplemento (dose diária indicada pelo fabricante, no rótulo do suplemento – Tabela 5). Usando como exemplo a amostra PV02: deve ser ingerida uma cápsula por dia (0,55 g/dia). Considerando que o resultado obtido para concentração de Cr (Tabela 11) para essa amostra foi de 17,6 mg kg<sup>-1</sup>, foi calculado quanto do analito está presente em 0,55 g. O resultado de 9,7 µg Cr consiste na quantidade de analito consumido diariamente. A Tabela 12 apresenta as informações de rotulagem de Cr e Fe e a quantidade de Cr e Fe calculada por dose diária.

**Tabela 12.** Valores de Cr e Fe, por dose diária recomendada pelo fabricante, e valores informados no rótulo dos suplementos analisados. Calculados a partir das concentrações de Cr e Fe disponíveis na Tabela 12.

<b>Código</b>	<b>Cr Rótulo (µg)</b>	<b>Cr/dose diária (µg)</b>	<b>Fe Rótulo (mg)</b>	<b>Fe/dose diária (mg)</b>
WP01	n.i.	127,4	n.i.	9,66
WP02	n.i.	37,5	n.i.	2,70
CE01	n.i.	0,41	n.i.	0,18
CO01	n.i.	6,0	n.i.	0,25
CO02	33,0	8,0	n.i.	<LOQ
IS	n.i.	1,4	n.i.	0,71
PV01	35,0	14,2	3,5	6,29
PV02	25,0	9,7	14,0	1,64
PV03	n.i.	2,9	10,0	10,40
VD	35,0	20,0	10,0	8,78

n.i. = Não Informado

Foi encontrado Cr em todas as amostras avaliadas, mesmo que os rótulos de algumas amostras (WP01, WP02, CE01, CO01, IS e PV03) não informassem a sua presença. Nas amostras CO02, PV01, PV02 e VD, os valores encontrados

correspondem a 24, 41, 39 e 57 % dos valores informados nos rótulos, respectivamente.

Já o Fe foi encontrado na maioria das amostras, exceto na CO02, para a qual ficou abaixo do LOQ ( $<2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Porém, apenas o rótulo das amostras PV01, PV02, PV03 e VD apontaram a presença desse elemento, sendo encontrado 180, 12, 104 e 88 % dos valores declarados nos rótulos, respectivamente. Embora os valores encontrados difiram significativamente daqueles declarados nos rótulos, para a maioria das amostras, eles se encontram dentro das faixas estabelecidas pela IN N° 102 15 de outubro de 2021 da ANVISA<sup>11</sup>. Para a presença de Cr, os valores aceitáveis, para a faixa etária de 19 anos, estão entre 5,25 e 250  $\mu\text{g}$ , e para Fe na faixa de 2,7 e 34,31 mg. Apenas a amostra PV02 apresentou valor (1,64 mg) abaixo do mínimo aceitável para Fe, de 2,7 mg.

Embora os valores encontrados sejam concordantes com a legislação, a presença desses metais sem a correta indicação no rótulo, pode ser prejudicial à saúde, já que sua ingestão não é esperada. No caso de Cr, não é considerado prejudicial à saúde se estiver presente na forma de Cr III, por ser um elemento essencial<sup>15-16</sup>. Além disso, a quantificação de Cr e Fe em amostras que não indicam a presença desses metais no rótulo, pode levantar questões sobre a conformidade regulatória, especialmente considerando as diretrizes da FDA, que exigem que os suplementos contenham apenas os ingredientes declarados no rótulo<sup>3</sup>. Esses dados indicam a necessidade de uma maior fiscalização desses produtos e de métodos analíticos confiáveis para determinar a presença de metais, de forma a garantir a segurança do consumo de suplementos<sup>3</sup>.

## 6. Conclusão

Após o estudo desenvolvido utilizando a análise direta de sólidos por HR-CS GF AAS, observou-se que o  $H_2SO_4$  não se mostrou tão eficiente como modificador químico na estabilização térmica do Cd em comparação ao Pd/Mg. A mistura de Pd/Mg foi mais eficiente, gerando resultados livres de interferências, precisos e confiáveis. A massa de modificador empregada em todos os experimentos foi de 5/3  $\mu g$  Pd/Mg.

A exatidão do método foi confirmada pela i) análise do material de referência SRM NIST 1573a *Tomate Leaves* e ii) comparação dos resultados da análise direta de sólidos por HR-CS GF AAS com os resultados obtidos por digestão ácida e análise por LS-GF AAS. Os resultados do teste *t*-Student e de intervalo de confiança confirmaram que o método proposto gera resultados exatos.

Os valores de LOD e LOQ para Cd, Cr e Fe estão abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação, o que confirma a sensibilidade do método analítico e sua conformidade com as regulamentações.

A identificação de Cr e Fe em algumas amostras que não declararam a presença desses elementos em seus rótulos levanta questões sobre a conformidade regulatória desses produtos. Os resultados sugerem a necessidade de uma maior conformidade regulatória por parte dos fabricantes de suplementos, especialmente em relação à declaração precisa de ingredientes nos rótulos.

A análise direta de sólidos oferece várias vantagens em relação ao método convencional de digestão ácida assistida por micro-ondas, incluindo maior rapidez, menor manipulação de amostras, menor risco de contaminação e menor geração de resíduos. Com isso, o método proposto se apresenta como uma alternativa atrativa, gerando resultados confiáveis de forma mais sustentável.

## Referências

1. Augustsson, A.; Qvarforth, A.; Engstrom, E.; Paulukat, C.; Rodushkin, I. Trace and major elements in food supplements of different origin: Implications for daily intake levels and health risks. *Toxicology Reports*, **2021**, 8, 1067–1080.
2. Lam, M.; Khoshkhat, P.; Chamani, M.; Shahsavari, S.; Dorkoosh, F. A.; Rajabi, A.; Maniruzzaman, M.; Nokhodchi, A. In-depth multidisciplinary review of the usage, manufacturing, regulations & market of dietary supplements. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2022**, 67, 102985.
3. Smichowski, P.; Londonio, A. The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: A review. *Microchemical Journal*, **2018**, 136, 113–120.
4. Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres (ABIAD). Disponível em: <https://abiad.org.br>
5. Raman, P.; Patino, L.; Nair, M. Evaluation of Metal and Microbial Contamination in Botanical Supplements. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, **2004**, 52, 7822-7827.
6. Harris, E. S. J.; Cao, S.; Littlefield, B. A.; Craycroft, J. A.; Scholten, R.; Kaptchuk, T.; Fu, Y.; Wang, W.; Liu, Y.; Chen, H.; Zhao, Z.; Clardy, J.; Woolf, A. D.; Eisenberg, D. M. Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese Herbal Medicines. *Science of the Total Environment*, **2011**, 409, 4297–4305.
7. Krejčová, A.; Ludvíková, I.; Černohorsky, T.; Pouzar, M. Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. *Food Chemistry*, **2012**, 132, 588–596.



8. Hedegaard, R. V.; Rokkjær, I.; Sloth J. J. Total and inorganic arsenic in dietary supplements based on herbs, other botanicals and algae a possible contributor to inorganic arsenic exposure. *Anal Bioanal Chem*, **2013**, 405 4429–4435.
9. Dolan, S. P.; Nortrup, D. A.; Bolger, P. M.; Capar, S. G. Analysis of Dietary Supplements for Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of AGRICULTURAL And FOOD CHEMISTRY*, **2003**, 51, 1307-1312.
10. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 28, de 26 de julho de 2018. **2018**, ANVISA.
11. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 102, de 15 de outubro de 2021. **2021**, ANVISA.
12. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. v. I, **2019**, ANVISA.
13. “Cádmio e seus compostos”. FIT (ficha de informação toxicologia), 2022. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2022/02/Cadmio.pdf>.
14. Wang, R.; Sang, P.; Guo, Y.; Jin, P.; Cheng, Y.; Yu, H.; Xie, Y.; Yao, W.; Qian, H. Cadmium in food: Source, distribution and removal. *Food Chemistry*, **2023**, 405, 134666.
15. Mulware, S. J. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech*, **2013**, 3, 85.
16. Monga, A.; Fulke, A. B.; Dasgupta, D. Recent developments in essentiality of trivalent chromium and toxicity of hexavalent chromium: Implications on human health and remediation strategies. *Journal of Hazardous Materials Advances*, **2022**, 7, 100113.

17. Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2019**, 195, 120–129.
18. Li, X.; Duan, X.; Tan, D.; Zhang, B.; Xu, A.; Qiu, N.; Chen, Z. Iron deficiency and overload in men and woman of reproductive age, and pregnant women. *Reproductive Toxicology*, **2023**, 118, 108381.
19. Martínez-Navarrete, N.; Camacho, M.M.; Martínez-Lahuerta, J.; Martínezmonzó, J.; Fito, P. Iron deficiency and iron fortified foods - a review. *Food Research International*, **2002**, 35, 225-231.
20. Brissot, P.; Troadec, M-B.; Loréal, O.; Brissot, E. Pathophysiology and classification of iron overload diseases; update 2018. *Transfusion Clinique et Biologique*, **2019**, 26, 80–88.
21. Institute of Medicine, 2003. Dietary Reference Intakes: Guiding Principles for Nutrition Labeling and Fortification. The National Academies Press, Washington, DC <https://doi.org/https://doi.org/10.17226/10872>.
22. Marrero, J.; Rebagliati, R.J.; Leiva, E.; Londonio, A.; Smichowski, P. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: Are the concentrations declared in the labels accurate?. *Microchemical Journal*, **2013**, 108, 81-86.
23. Udousoro, I.; Ikem, A.; Akinbo, O. T. Content and daily intake of essential and potentially toxic elements from dietary supplements marketed in Nigeria. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2017**, 62, 23-34.
24. Pereira, R. M.; Crizel, M. G.; Novo, D. L. R.; Santos, C. M. M. D.; Mesko, M. F. Multitechnique determination of metals and non-metals in sports supplements after microwave-assisted digestion using diluted acid. *Microchemical Journal*, **2019**, 145, 235-241.

25. Begu, E.; Snell B.; Arslan, Z. Simultaneous separation of arsenic and cadmium from interfering salt matrix of multivitamin/mineral supplements by sequential coprecipitation and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*, **2019**, 145, 412-418.
26. Figueiredo, A.; Fernandes, T.; Costa, I. M.; Gonçalves, L.; Brito, J. Feasibility of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the determination of metal impurities in pharmaceutical products and dietary supplements in view of regulatory guidelines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2016**, 122 52–58.
27. Figueiredo, A.; Costa, I. M.; Fernandes, T. A.; Gonçalves, L. L.; Brito, J. Food Supplements for Weight Loss: Risk Assessment of Selected Impurities. *Nutrientes*, **2020**, 12, 954.
28. García-Rico, L.; Tejeda-Valenzuela, L. Total and inorganic arsenic in dietary supplement supplies in northern Mexico. *Environ Monit Assess*, **2013**, 185, 6111-6117.
29. Kowalski, A.; Frankowski, M. Levels and potential health risks of mercury in prescription, non-prescription medicines and dietary supplements in Poland. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2015**, 73, 396-400.
30. Corazza, M. Z.; Tarley, C. R. T. Development and feasibility of emulsion breaking method for the extraction of cadmium from omega-3 dietary supplements and determination by flow injection TS-FF-AAS. *Microchemical Journal*, **2016**, 145–151, 127.
31. Ćwieląg-Drabek, M.; Piekut, A.; Szymala, I.; Oleksiuk, K.; Razzaghi, M.; Osmala, W.; Jabłońska, K.; Dziubanek, G. Health risks from consumption of medicinal plant dietary supplements. *Food Science & Nutrition*, **2020**, 8, 3535-3544.

32. Fischer, A.; Brodziak-Dopierała, B.; Mońka, I.; Loska, K.; Stojko, J. DIETARY SUPPLEMENTS AS ADDITIONAL SOURCES OF ZINC IN THE HUMAN ORGANISM. *FARMACIA*, **2021**, 69, 2.
33. Gómez-Nieto, B.; Gismera, M. J.; Sevilla, M. T., Procopio, J. R. Determination of essential elements in beverages, herbal infusions and dietary supplements using a new straightforward sequential approach based on flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, **2017**, 219, 69-75.
34. Stilinović, N.; Škrbić, B.; Živančev, J.; Mrmoš, N.; Pavlović, N.; Vukmirović, S. The level of elements and antioxidant activity of commercial dietary supplement formulations based on edible mushrooms. *Food & Function*, **2014**, 3170, 5.
35. Stanisz, E.; Werner, J. Ligandless, Task-Specific Ionic Liquid-Based Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of Cobalt Ions by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Letters*, **2017**, 50, 18, 2884–2899.
36. Mustatea, G.; Ungureanu, E. L.; Iorga, S. C.; Ciotea, D.; Popa, M. E. Risk Assessment of Lead and Cadmium in Some Food Supplements Available on the Romanian Market. *Foods*, **2021**, 581, 10.
37. Krawczyk, M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2014**, 88, 377-384.
38. Adolfo, F. R.; Do Nascimento, P. C.; Leal, G. C.; Bohrer, D.; Viana, C.; De Carvalho, L. M.; Colim, A. N. Simultaneous determination of iron and nickel as contaminants in multimineral and multivitamin supplements by solid sampling HR-CS GF AAS. *Talanta*, **2019**, 195, 745-751.
39. Leal, G. C.; Mattiazzi, P.; Rovasi, F.; Dal Molin, T.; Bohrer, D.; Do Nascimento, P. C.; De Carvalho, L. M.; Viana, C. Determination of lead in dietary

supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2020**, 86, 103360.

40. Leal, G. C.; Rovasi, F.; Maziero, M.; Do Nascimento, P. C.; De Carvalho, L. M.; Viana, C. Emulsion breaking-induced extraction of Cd and Pb from oily dietary supplements followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2022**, 112, 104651.

41. Skoog, D. A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Couch, S.R. Fundamentos de Química Analítica, 8 ed., Cengage Learning, São Paulo, Brasil, 2013.

42. Nölte J. ICP Emission Spectrometry: A Practical Guide. Wiley-VCH: Weinheim, **2003**.

43. Krug, F. J.; Rocha, F.R.P. Métodos de preparo de Amostras para análise elementar. EditSBQ: São Paulo, **2016**, 58.

44. Resano, M.; Aramendía, M.; Belarra, M. A. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: a tutorial review. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2014**, 2229, 29.

45. Welz, B.; Borges, D. L.G.; Lepri, F. G.; Vale, M. G. R.; Heitmann, U. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — An analytical and diagnostic tool for trace analysis. *Spectrochimica Acta Part B*, **2007**, 62, 873-883.

46. Welz, B.; Schlemmer, G.; Mudakavi, J.R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 7 (**1992**) 1257.

47. Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed. Wiley-VCH: Weinheim, **1999**.

48. Welz, B.; Vale, M. G. R.; Borges, D. L. G.; Heitmann, U. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 2085, 389.
49. Krug, F.J., Nóbrega, J.A., Oliveira, P.V. Apostila de AAS Parte 2. Atomização eletrotérmica em forno de grafite, maio de 2007.
50. G. Schlemmer, B. Welz. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **41** (1986), 1157–1165.
51. Koirtjohann, S. R.; *Spectrochim. Acta Part B* **1980**, 35, 663-670.
52. Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; Weisse, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **1996**, 355, 300-303.
53. Heitmann, U.; Schütz, M.; Becker-Ross, H.; Florek, S. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines Referências by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. *Spectrochimica Acta Part B*, **1996**, 51, 1095-1105.
54. Heitmann, U.; Welz, B.; Borges, D. L. G.; Lepri, F. G. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta - Part B*, **2007**, 62, 1222-1230.
55. Welz, B.; Borges, D.L.G.; Lepri, F.G.; Vale, M.G.R.; Heitmann, U.; *Spectrochim. Acta Part B* **2007**, 62, 873-883.
56. Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U. *High-Resolution Continuum Source AAS*, Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.

57. Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U. High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry. 1st ed. Wiley – VCH: Weinheim, **2005**.
58. Borges, D. L.G.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Heitmann, U. FUNDAMENTOS DA ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA. *Revista Analytica*, **2005**, 18.
59. Gómez-Nieto, B.; Motyzhov, V.; Gissera, M. J.; Procopio, J. R.; Sevilla, M. T. Fast-sequential determination of cadmium and copper in milk powder and infant formula by direct solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, **2020**, 159, 105335.
60. Dos Santos, N. k. V.; Dos Santos, L.; Damin, I. C. F.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B. Multielement determination of metals in edible seeds by HR-CS GF AAS and direct analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2022**, 111, 104625.
61. Resano, M.; Flórez, M. R.; García-Ruiz, E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. *Spectrochimica Acta Part B*, **2013**, 88, 85-972.
62. Boschetti, W.; Orlando, M.; Dullius, M.; Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; De Andrade, J. B. Sequential and simultaneous determination of four elements in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic and molecular absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom*, **2016**, 1269, 31.
63. Maciel, T. D. Estudo de modificadores químicos para a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares usando análise direta de sólidos e espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite. - Dissertação de Mestrado, UFRGS, **2021**.

64. Leao, D. J.; Junior, M. M. S.; Brandão, G. C.; Ferreira, S. L. C. Simultaneous determination of cadmium, iron and tin in canned foods using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **2016**, 153, 45-50.
65. Boschetti, W.; Orlando, M.; Dullius, M.; Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; De Andrade, J. B. Sequential and simultaneous determination of four elements in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic and molecular absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom*, **2016**, 1269, 31.
66. Dos Santos, L. M. G.; Welz, B.; Araujo, R. G. O.; Jacob, S. Do C.; Vale, M. G. R.; Martens, A.; Martens, I. B. G.; Becker-Ross, H. Simultaneous Determination of Cd and Fe in Beans and Soil of Different Regions of Brazil Using High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Direct Solid Sampling. *J. Agric. Food Chem*, **2009**, 57, 10089-10094.
67. Dos Santos L. M. G.; Araujo, R. G. O.; Welz, B.; Jacob, S. do C.; Vale, M. G. R.; Becker-Ross, H. Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **2009**, 78, 577–583.
68. Dittert, I.M.; Silva, J.S.A.; Araujo, R. G. O.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Becker-Ross, H. Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, **2009**, 64, 537-543.
69. Welz, B.; Dos Santos, L. M. G.; Araujo, R. G. O.; Jacob, S. Do C.; Vale, M. G. R.; Okruss, M.; Becker-Ross, H. Unusual calibration curves observed for iron using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, **2010**, 65, 258–262.



70. Kurfürst, U. Solid sample analysis: direct and slurry sampling using GFAAS and ETV-ICP. Ed Springer: Berlin, **1998**.

71. AOAC, International. Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *International AOAC*, **2016**.

72. ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. **2020**.

73. Belarra, M. A.; Resano, M.; Vanhaecke, F.; Moens, L. Direct solid sampling with electrothermal vaporization / atomization: what for and how?. *Trends in analytical chemistry*, **2002**, 21, 12.

74. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins C.H.; Jardim, I.C.S.J.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, **2004**, 771, 27.