

**Aplicação de Métodos Quimiométricos na Análise
Direta de Constituintes Inorgânicos em Leite
Materno por Espectrometria de Absorção Atômica
em Forno de Grafite**

Paulo Celso Pereira Lara

**UFMG 728
D433**

Paulo Celso Pereira Lara

**Aplicação de Métodos Quimiométricos na Análise Direta de
Constituintes Inorgânicos em Leite Materno por Espectrometria
de Absorção Atômica em Forno de Grafite**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2008

Lara, Paulo Celso Pereira

Aplicação de métodos quimiométricos na análise direta de constituintes inorgânicos em leite materno por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite / Paulo Celso Pereira Lara. 2008.

xx, 123 f. : il.

Orientador: José Bento Borba da Silva.

Co-Orientadora: Josianne Nicácio Silveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Espectroscopia de absorção atômica – Teses 3. Quimiometria – Teses 4. Leite humano - teses I. Silva, José Bento Borba da, Orientador II. Silveira, Josianne Nicácio, Co-Orientadora III. Título.

*A minha adorada mãe, Nádia, e
minha querida irmã, Catherine, pelo
incentivo e principalmente pelo amor
e por acreditarem em mim.*

Agradecimentos

A Deus, pela vida, pela saúde, pela inteligência, por minha família e pela oportunidade de fazer este mestrado.

Ao Prof. Dr. José Bento pela inestimável amizade, orientação, por todos os seus ensinamentos e pelas oportunidades de sempre aprender um pouco mais.

A Prof. Dra. Josianne Nicácio pelos ensinamentos, por me iniciar no forno de grafite, pelo incentivo, pelas intermináveis horas que passamos em frente ao computador estudando e principalmente pela sua amizade.

Ao Dr. Waldomiro pelos ensinamentos em quimiometria, pelos momentos de descontração e principalmente pela amizade.

A minha família pelo apoio e incentivo.

A todos os amigos do Grupo de Espectrometria Atômica e Preparo de Amostras pelo convívio, sugestões e apoio.

As funcionárias do Laboratório de Toxicologia da faculdade de farmácia da UFMG pela amizade.

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

E ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

A todos vocês, meu muito obrigado!

Só depende de nós...

"Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.

Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.

Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar.

Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.

O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.

Tudo depende só de mim."

Charles Chaplin

Resumo

Neste trabalho estão descritos os desenvolvimentos (otimização e validação) de métodos para análise direta de Mn, Cu, Cr e Pb em leite materno sem necessidade de digestão prévia das amostras para a quantificação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Para o desenvolvimento dos métodos para determinação de manganês e cobre, hidroximetilaminometano (TRIS) e monoetanolamina foram avaliados como possíveis diluentes do leite materno (sendo que o TRIS apresentou melhor exatidão para ambos os metais), enquanto que para cromo e chumbo apenas o TRIS foi avaliado. Os parâmetros de análise foram obtidos por meio de otimização multivariada, que consistiu em experimentos para escolha de modificadores químicos, experimentos para avaliação preliminar de variáveis (planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}) seguido de uma metodologia de superfície de resposta (planejamento composto central). Nos experimentos foram avaliadas as melhores temperaturas de pirólise e de atomização, o tempo de pirólise e o uso de modificadores químicos (permanentes ou associados ao modificador em solução). O efeito de matriz foi avaliado em cada método por meio de testes estatísticos F e t de Student, sendo que, em alguns casos, a calibração aquosa foi viável. A sensibilidade foi avaliada através das massas características e dos limites de detecção. Estudos de exatidão foram efetuados através de recuperações dos metais em amostras artificialmente contaminadas e, quando possível, também foi utilizado material de referência certificado. A precisão foi determinada em ensaios efetuados em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em três dias diferentes (precisão inter-ensaio). Os métodos apresentaram bons resultados para precisão e exatidão e também baixos limites de detecção. Ao final do desenvolvimento da metodologia algumas amostras foram analisadas.

Abstract

In this work is described the methodology developments (optimization and validation) for direct quantification of Mn, Cu, Pb and Cr in breast milk without need of previous sample digestion following determination by furnace graphite atomic absorption spectrometry (GF AAS). For the development of methods for analysis of manganese and copper, monoethanolamine and hidroximetilaminometano (TRIS) were evaluated as possible diluents for the breast milk (being that the TRIS presented better accuracy for both metals), whereas for chromium and lead only hidroximetilaminometano was evaluated. The optimization of the parameters of analysis was done through multivariate optimization, which consisted of experiments to choice of modifiers, experiments to preliminary assessment of variables (fractional factorial design 2^{4-1}) followed by a methodology surface of response (central composite design). For all the optimizations were evaluated the best atomization and pyrolysis temperatures, the pyrolysis time and the best modifier (permanent or associated with the chemical modifier). The effect of the matrix was assessed in each method through statistical tests F and t Student, and, in some cases, the aqueous calibration was possible. The sensitivity was examined by the characteristic mass and detection limits of detection. Studies on accuracy were made by recoveries of metals in artificially contaminated samples and, where possible, was also used certified reference material. The precision was determined in tests performed on the same day (intra-assay precision) and on three different days (inter-assay precision). The methods showed good results for precision and accuracy and low limits of detection. At the end of the development of the methods some samples were analyzed.

Lista de figuras

Figura 1 – Planejamentos compostos centrais: (a) dois e (b) três fatores.	37
Figura 2 – Vista de um tubo com plataforma de L'vov no momento da deposição de uma solução.	49
Figura 3 – Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando MEA como diluente na análise de Mn (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9942$).	59
Figura 4 - Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Mn (coeficiente de ajuste do modelo $R = (0,8692)$).	59
Figura 5 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central utilizando MEA como diluente na análise de Mn (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).	62
Figura 6 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central utilizando TRIS como diluente na análise de Mn (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).	63
Figura 7 - Superfície de resposta gerada pelo planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Mn.	64
Figura 8 – Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias ($n=3$) para estudo do efeito de matriz na análise de Mn em leite materno.	67
Figura 9 – Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Cu (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9942$).	75
Figura 10 – Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando MEA como diluente na análise de Cu (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9942$).	75
Figura 11 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central utilizando MEA como diluente na análise de Cu (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).	79
Figura 12 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central	80

utilizando TRIS como diluente na análise de Cu (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).

- Figura 13** – Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias (n=3) para estudo do efeito de matriz na análise de Cu em leite materno. **82**
- Figura 14** - Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Cr (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9889$). **88**
- Figura 15** - Gráfico de Pareto gerado por planejamento composto central utilizando TRIS como diluente na análise de Cr (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado). **90**
- Figura 16** - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr. **91**
- Figura 17** - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis tempo de pirólise e temperatura de atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr. **91**
- Figura 18** - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperatura e tempo de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr. **92**
- Figura 19** - Gráfico de Pareto gerado por segundo planejamento composto central) utilizando TRIS como diluente na análise de Cr (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado). **94**
- Figura 20** - Superfície de resposta gerada por segundo planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr. **94**
- Figura 21** - Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias (n=3) para estudo do efeito de matriz na análise de Cr em leite materno. **96**
- Figura 22** - Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Pb (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9911$). **104**
- Figura 23** - Gráfico de Pareto gerado por planejamento composto central utilizando TRIS como diluente na análise de Pb (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado). **106**

Figura 24 - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Pb.	106
Figura 25 - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperatura atomização e tempo de pirólise utilizando TRIS como diluente na análise de Pb.	107
Figura 26 - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas e tempo de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Pb.	107
Figura 27 – Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias (n=3) para estudo do efeito de matriz na análise de Pb em leite materno.	109

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Matrizes dos planejamentos compostos centrais com duas e três variáveis	38
Tabela 2 - Parâmetros instrumentais e condições operacionais para o GF AAS	47
Tabela 3 - Programa de temperatura de forno para tratamento da plataforma de grafite com modificadores permanentes	50
Tabela 4 - Programa aquecimento recomendado pelo fabricante para análise de Mn por GF AAS	56
Tabela 5 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Mn em leite materno utilizando TRIS como diluente	56
Tabela 6 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Mn em leite materno utilizando MEA como diluente	57
Tabela 7 - Matriz de planejamento fatorial e absorvâncias obtidas para otimização das variáveis para análise de Mn em leite materno utilizando TRIS e MEA como diluentes	58
Tabela 8 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Mn em leite materno utilizando o diluente MEA	61
Tabela 9 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Mn em leite materno utilizando o diluente TRIS	62
Tabela 10 - Programas de aquecimento de forno otimizados para análise de Mn em leite materno utilizando TRIS ou MEA como diluentes (valores entre parênteses referem-se às condições ótimas para MEA)	65
Tabela 11 - Resultados obtidos para Mn após determinação no SRM NIST 1846 por GF AAS em cada diluente	66
Tabela 12 – Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Mn em leite materno	67
Tabela 13 - Resultados para precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Mn	68
Tabela 14 - Parâmetros de mérito para análise de manganês em leite materno.	68
Tabela 15 - Concentração de manganês em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor \pm desvio padrão) (n = 3)	70
Tabela 16 - Programa de aquecimento de forno recomendado pelo fabricante para análise de Cu	72

Tabela 17 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Cu em leite materno utilizando TRIS como diluente	72
Tabela 18 - Resultado da seleção de modificadores químicos para otimização das condições analíticas na determinação Cu em leite materno utilizando MEA como diluente	73
Tabela 19 - Matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e absorvâncias obtidas para variáveis para análise de Cu em leite materno utilizando TRIS como diluente	74
Tabela 20 - Matriz de planejamento fatorial e absorvâncias obtidas para otimização das variáveis para análise de Cu em leite materno utilizando MEA como diluente	74
Tabela 21 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cu em leite materno utilizando o diluente MEA	77
Tabela 22 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cu em leite materno utilizando o diluente TRIS	78
Tabela 23 - Programa de forno otimizado para análise de Cu em leite materno utilizando TRIS ou MEA como diluentes	80
Tabela 24 - Resultados obtidos para Cu após determinação no SRM NIST 1846 por GF AAS em cada diluente	81
Tabela 25 - Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Cu em leite materno	82
Tabela 26 - Resultados para precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Cu	83
Tabela 27 - Parâmetros de mérito para análise de cobre em leite materno	84
Tabela 28 - Concentração de cobre em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor \pm desvio padrão) (n = 3)	84
Tabela 29 - Programa de aquecimento de forno recomendado pelo fabricante para análise de Cr	86
Tabela 30 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas para determinação de Cr em leite materno utilizando TRIS como diluente	86
Tabela 31 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para variáveis para análise de Cr em leite materno utilizando TRIS como diluente	88
Tabela 32 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cr em leite materno utilizando o diluente TRIS	89
Tabela 33 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por segundo planejamento	93

composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cr em leite materno utilizando o diluente TRIS	
Tabela 34 - Programa de aquecimento de forno otimizado para análise de Cr em leite materno usando TRIS como diluente	95
Tabela 35 - Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Cr em leite materno	96
Tabela 36 - Resultados da precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Cr	98
Tabela 37 - Parâmetros de mérito para análise de cromo em leite materno	98
Tabela 38 - Concentração de cromo em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor \pm desvio padrão) (n = 3)	99
Tabela 39 - Programa de aquecimento de forno recomendado pelo fabricante para análise de Pb	101
Tabela 40 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente	102
Tabela 41 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente com co-injeção de 5 μ L de Nb	102
Tabela 42 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente com co-injeção de 5 μ L de Rh	103
Tabela 43 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento fatorial fracionário 2 ⁴⁻¹ para variáveis na análise de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente	104
Tabela 44 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Pb em leite materno utilizando o diluente TRIS	105
Tabela 45 - Programa de aquecimento de forno otimizado para análise de Pb em leite materno usando TRIS como diluente	108
Tabela 46 - Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Pb em leite materno	109
Tabela 47 - Resultados da precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Pb	111
Tabela 48 - Parâmetros de mérito para análise de chumbo em leite materno	111
Tabela 49 - Concentração de chumbo em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor \pm desvio padrão) (n = 3)	112

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

ASV – Voltametria de redissolução anódica

CCD – Planejamento composto central

CFA-C – Mistura de amins terciárias comercial

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

ILZSG – International Lead and Zinc Study Group

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

EDL – Lâmpada de descarga sem eletrodos

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama

FI-HG AAS – Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e injeção em fluxo

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

ICP-MS – Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente

ICP OES – Espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma acoplado indutivamente

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MEA – Monoetanolamina

MRC – Material de referência certificado

OMS – Organização Mundial da Saúde

TRIS – hidroximetilaminometano

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância

UV/Vis – Ultravioleta/visível

STPF – Forno Plataforma de Temperatura Estabilizada

Sumário

Agradecimentos	v
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xvi
Sumário	xviii
1. Introdução	18
2. Os metais	21
2.1. Manganês	21
2.2. Cobre	23
2.3. Cromo	24
2.4. Chumbo	26
3. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite	28
3.1. Modificadores químicos	29
3.2. Modificadores permanentes	30
4. Quimiometria	33
4.1. Planejamento Fatorial	34
4.2. Planejamento fatorial fracionário	35
4.3. Metodologia de superfície de resposta	35
4.3.1. Planejamento composto central	36
5. Validação analítica	39
5.1. Linearidade	39
5.2. Seletividade – Interferência de matriz	40
5.3. Limite de detecção	42
5.4. Limite de quantificação	43
5.5. Precisão	44
5.6. Exatidão	45
5.6.1. Materiais de referência certificados	45
5.6.2. Recuperação	46
6. Materiais e métodos	47
6.1. Material	47
6.1.1. Equipamentos e acessórios	47
6.1.2. Reagentes e vidraria	48
6.1.3. Materiais de referência	49
6.2. Tratamento do tubo de grafite com modificadores permanentes	49
6.3. Amostras e tratamento de amostras	50
7. Estratégia de otimização das condições analíticas	51

8. Estratégias de Validação	52
8.1. Procedimentos	52
8.2. Cálculo dos parâmetros de mérito	54
9. Resultados e discussão	54
9.1. Determinação de Mn em leite materno por GF AAS	54
9.1.1. Otimização das condições analíticas	55
9.1.2. Validação da metodologia para análise de Mn em leite materno por GF AAS	66
9.1.3. Determinação de manganês em amostras de leite materno por GF AAS	70
9.1.4. Conclusões para manganês em leite materno	71
9.2. Determinação de Cobre em leite materno por GF AAS	71
9.2.1. Otimização das condições analíticas	72
9.2.2. Validação da metodologia para análise de Cu em leite materno por GF AAS	82
9.2.3. Determinação de cobre em amostras de leite materno por GF AAS	85
9.2.4. Conclusões da determinação de cobre em leite materno	86
9.3. Determinação de Cromo em leite materno por GF AAS	86
9.3.1. Otimização das condições analíticas	87
9.3.2. Validação da metodologia para análise de Cr em leite materno por GF AAS	96
9.3.3. Determinação de cromo em amostras de leite materno por GF AAS	99
9.3.4. Conclusões para determinação de cromo em leite materno	100
9.4. Determinação de Chumbo em leite materno por GF AAS	101
9.4.1. Otimização das condições analíticas	101
9.4.2. Validação da metodologia para análise de Pb em leite materno por GF AAS	109
9.4.3. Determinação de chumbo em amostras de leite materno por GF AAS	112
9.4.4. Conclusões para determinação de chumbo em leite materno	113
10. Conclusões finais	114
11. Referências Bibliográficas	116

1. Introdução

O aleitamento materno é um modo insubstituível de fornecer o alimento ideal para o crescimento e desenvolvimento saudável de recém-nascidos e além disso, tem importante influência biológica e emocional na saúde tanto de mães quanto de crianças (OMS/UNICEF, 1989). A alimentação deficiente no primeiro ano de vida é o fator mais influente de comprometimento do desenvolvimento físico da criança, sendo que o sistema nervoso é o mais comprometido, seguido do sistema osteomuscular (LEONE, 1999).

Uma série de fatores relacionados com os hábitos alimentares e de vida das mães, pode influenciar diretamente na presença e teores de elementos essenciais e tóxicos no leite (nível sócio-econômico, faixa etária, consumo de álcool ou cigarro, tipo de alimentação, entre outros). A escolha de um método analítico para determinar elementos-traço em leite materno oferece certas dificuldades como: concentrações baixas na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, o risco de contaminação durante o tratamento da amostra, a complexidade da matriz e em muitos dos casos a quantidade de amostra disponível é limitada (SILVESTRE et al, 2000). Assim, para este tipo de análise torna-se importante a utilização de uma técnica que seja sensível, se possível ser livre de interferências, que inclua um simples ou nenhum preparo da amostra, seja rápida e que tenha precisão e exatidão adequadas, como por exemplo, a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Além disso, uma das características que apontam a técnica de GF AAS como uma ferramenta eficaz para tal tipo de determinação é a possibilidade de destruição *in situ* da matriz no interior de um tubo de grafite. A destruição da matriz ocorre durante a etapa de pirólise sem a necessidade de digestão prévia da amostra. A digestão da amostra, em muitos casos, é a etapa determinante da análise, possibilitando

a perda do analito (principalmente para elementos voláteis ou quando se utiliza temperaturas elevadas), ou o que é mais comum, a contaminação das amostras pelos reagentes, da vidraria empregada e do próprio manuseio desta pelo analista. (SILVEIRA, 2007)

Os elementos determinados em materiais biológicos podem ser classificados como essenciais, não essenciais e tóxicos. Alterações nas concentrações desses elementos em fluidos e tecidos biológicos podem resultar em uma variedade de condições patológicas, e a determinação desses metais pode fornecer informações para diagnósticos e tratamentos de uma grande variedade de desordens metabólicas hereditárias ou adquiridas. Por isso, é de extrema importância o monitoramento da exposição de grupos populacionais a poluentes ambientais e industriais de um modo mais efetivo e constante. (TELISMAN, 1995)

Neste trabalho, métodos quimiométricos de otimização como planejamento fatorial aliado à metodologia de superfície de resposta, planejamento composto central, foram empregados na obtenção das condições analíticas para determinação direta de manganês, cobre, cromo e chumbo em amostras de leite humano, empregando a técnica de GF AAS.

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 1994) recomenda que o aleitamento materno exclusivo, isto é, somente leite humano, seja mantido até seis meses e complementado com outros alimentos até no mínimo dois anos de idade, por conter todos os macronutrientes (tais como proteínas, lipídeos e carboidratos) e todos micronutrientes (elementos, vitaminas e enzimas) (MARTINO et al, 2001; BOCCA et al., 2000). A adequada ingestão de minerais durante esse período permite o desenvolvimento de tecidos corporais, bem como a maturação e funcionalidade de vários sistemas enzimáticos. Elementos essenciais estão envolvidos na forma de

metaloproteínas e enzimas em vários processos bioquímicos, que representam um papel essencial para vida humana. Estes processos são mais importantes no caso de desenvolvimento e crescimento do bebê, porque durante a infância, o corpo humano mostra uma sensibilidade especial à deficiência de elementos essenciais e também à possibilidade de excesso destes elementos (podem se tornar tóxicos em concentrações elevadas). Entretanto, o leite também pode ser uma fonte de exposição a elementos tóxicos, que podem gerar riscos a saúde, especialmente de jovens e crianças.

O leite materno representa, incontestavelmente, o melhor alimento para a criança nos primeiros meses de vida (VICTORA et al; 1987). A OMS, a United Nations Children's Fund (UNICEF) e vários estudos destacam a necessidade e a importância de promover-se o aleitamento materno exclusivo como forma eficaz de prevenir doenças infecciosas (gastrointestinais, respiratórias e otites médias), enterocolite necrotizante (ou necrotizante), retocolite ulcerativa, doença de Crohn (essas três doenças citadas fazem parte das chamadas Doenças Inflamatórias Intestinais), de proteger contra alergias tardias, diabetes *mellitus* insulino-dependente, sobrepeso e disfunções cognitivas e de favorecer o crescimento e o desenvolvimento infantil (VICTORA et al., 1987). GOUVÊA (1998) reforça, ainda, a importante contribuição da amamentação no desenvolvimento da fala.

Os minerais presentes no leite materno são divididos em macroelementos e microelementos. Dentre os macroelementos estão: Na, K, cloreto, Ca e Mg. Os microelementos presentes no leite materno são: Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Co, Se, iodeto, fluoreto, Cr, Ni, Sn e V. Os microelementos são divididos em essenciais e possivelmente essenciais. Os microelementos essenciais englobam: Fe, Zn, Cu, Cr, Mn, Mo, Co, Se, iodeto e fluoreto. Dentre os possivelmente essenciais estão Ni, Sn e V (JENSEN, 1995). Alguns metais presentes no leite materno podem aparecer ligados às

proteínas e à lactose em proporções definidas para cada metal. Cerca de 60 – 80% deles estão presentes no soro, cerca de 10 – 30% estão presentes na caseína e cerca de 5 – 30% estão presentes na gordura.

2. Os metais

2.1. Manganês

O manganês é um sólido frágil, quebradiço, ou pode apresentar-se como pó branco-acinzentado. É um elemento amplamente distribuído na crosta terrestre, água e atmosfera, na forma particulada. Não há indícios de manganês na forma elementar livre, na natureza. Seus minerais mais abundantes são a pirolusita (MnO_2), manganita ($Mn_2O_3 \cdot H_2O$) e hausmanita (Mn_3O_4). Existem outros minerais de manganês onde o metal se encontra associado a sulfetos, carbonatos e silicatos (DANA, 1969).

O manganês possui muitas aplicações, onde se destaca a fabricação de ligas de ferro-manganês, a produção de aço, de baterias, de palitos de fósforo, de porcelanas e de materiais vítreos. O sulfato de manganês é utilizado como fertilizante (60% do consumo total) e como suplemento (30% do consumo total), sendo também usado na fabricação de cerâmicas e fungicidas, entre outros. O permanganato de potássio é um pó oxidante e utilizado como desinfetante, agente antialgas, agente de limpeza de metais e conservante de folhas e frutas frescas (ATSDR, 2000).

Estudos da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo de São Paulo, normalmente encontram valores de manganês em águas potáveis da ordem de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Raramente encontram-se teores maiores que 1 mg L^{-1} . Quando encontrado em concentrações

maiores que esta, pode causar alterações no sabor, tingimento de instalações sanitárias, manchas em roupas lavadas, dentre outros problemas (MARTINS E LIMA, 2001).

Em humanos e animais, o manganês é um nutriente essencial e desempenha função na mineralização dos ossos, metabolismo de proteínas, regulação metabólica, proteção celular de espécies de radicais livres, e síntese de glicosaminoglicanos (WEDLER et al, 1994). Manganês pode tanto ser um componente de metaloenzimas como também um ativador enzimático. Dentre as enzimas que contém manganês podemos citar: arginase, piruvato carboxilase, e manganês-superoxido dismutase (KEEN et al, 1990; NRC, 1989; WEDLER E KLIMIS-TAVANTIZIS, 1994). Manganês tem mostrado ser capaz de ativar numerosas enzimas com função catalítica ou reguladora, como por exemplo, transferases, descarboxilases, hidrolases (WEDLER; KLIMIS-TAVANTIZIS, 1994). Estudos sobre a distribuição do manganês no organismo mostram que os locais que apresentam as maiores concentrações do metal são os de maior atividade metabólica, como o fígado e o pâncreas, e os relacionados à eliminação, como os rins e o intestino delgado e grosso. Em contraste, os tecidos de baixa atividade metabólica como músculos esqueléticos, pele, bexiga, testículos, útero, ossos e tireóide, apresentam menores concentrações. Essa distribuição, provavelmente, se correlaciona com a quantidade de mitocôndrias do órgão ou tecido, organela onde o manganês se acumula. Os tecidos pigmentados, como o cabelo e a pele, se são escuros, tendem a acumular o manganês (OMS, 1981). Considerando o organismo total, a remoção do manganês apresenta meia vida biológica de 37 dias, sendo os ossos e o cérebro os locais de eliminação mais lenta (SIQUEIRA, 1984).

Exposições crônicas a níveis elevados de manganês causam danos neurológicos permanentes. Também foi constatado, em exposições crônicas a níveis bem menores, déficits na habilidade de executar movimentos rápidos com as mãos, problemas com a

coordenação e com o equilíbrio, acompanhado de outros sintomas como esquecimento, ansiedade ou insônia (ATSDR, 2000).

2.2. Cobre

O cobre é um metal de transição, avermelhado, que apresenta alta condutibilidade elétrica e térmica, só superada pela prata e o ouro. É possível que o cobre tenha sido o metal mais antigo a ser utilizado, pois se têm encontrado objetos de cobre de 8.700 a.C. Pode ser encontrado em diversos minerais e em sua forma nativa, na forma metálica, em alguns lugares. É utilizado atualmente para a produção de materiais condutores de eletricidade (fios e cabos), e em ligas metálicas como latão e bronze. Quando se utilizam caçarolas de cobre para a cocção de alimentos são frequentes as intoxicações, devido à ação dos ácidos da comida que originam óxidos, contaminando os alimentos (DANA, 1969).

O cobre é um elemento-traço essencial para a manutenção de vários processos biológicos, tais como metabolismo energético, homeostase de ferro e mecanismos de proteção antioxidante através da atividade da cobre-zinco superóxido dismutase, da ceruloplasmina e da metalotioneína e a quantidade diária de ingestão adequada para adultos é de 2,5 a 3 mg/dia (DANKS, 1995). No entanto, o cobre também participa de reações oxidativas que promovem a liberação de radicais livres, podendo prejudicar a integridade e a funcionalidade celular (KOURY, 2007).

O cobre é componente de grande número de proteínas e enzimas que desempenham funções biológicas fundamentais às células e que contribuem para a manutenção de sua homeostase. O cobre é um metal essencial aos seres vivos, mas também potencialmente tóxico às células pela facilidade de sofrer mudanças do estado

de oxidação na forma de íon livre (KOURY, 2007). O cobre contido em metaloenzimas é importante no metabolismo de ferro e na síntese de hemoglobina, elastina e colágeno, além de ajudar na eliminação de radicais livres. Cerca de 30% do cobre ingerido é absorvido no intestino, ligado a albumina e transportado para o fígado, onde é armazenado. A principal forma circulante de cobre é ligado a glicoproteína, ceruloplasmina, sintetizada no fígado, a qual contém de 6 a 8 átomos de cobre por molécula. Os níveis da ceruloplasmina podem aumentar grandemente em resposta a infecção, ferimentos, inflamações crônicas ou com os hormônios esteroidais (gravidez, algumas pílulas contraceptivas a base de estrogênio). O excesso de cobre é excretado na bile, sendo encontrado apenas pequenas quantidades na urina, a menos nos casos de doenças renais. A deficiência de cobre se apresenta como anemia microcítica hipocrômica e neutropenia, que é resistente à terapia com ferro. Crianças e recém-nascidos com dietas deficientes em cobre têm síntese ineficaz de colágeno, e podem desenvolver doenças ósseas (DANKS, 1995).

2.3. Cromo

O cromo é um dos metais mais utilizados em atividades humanas. É utilizado na fabricação de ligas (que apresentam alta resistência à corrosão e alta dureza), tintas, fitas magnéticas e eletrodos. É também utilizado em curtumes. Outras fontes antropogênicas são a fabricação de cimento, a construção civil, a soldagem, as lâmpadas e o lixo urbano. Como fontes naturais destacam-se as emissões vulcânicas e os incêndios florestais (DANA, 1969).1736

O metal está presente na natureza principalmente como $\text{Fe}(\text{CrO}_2)_2$, no mineral cromita. O cromo está presente em plantas, mas não há indícios de que seja essencial para os vegetais. Os alimentos que apresentam maiores concentrações de cromo são os pães e frutos do mar. Em humanos e animais Cr (III) é um nutriente essencial que participa do metabolismo de glicose, gordura e proteína, potencializando a ação da insulina (ANDERSON, 1981). Há suspeitas de que sua deficiência possa causar problemas para o coração (FERREIRA, 2002). Uma ingestão diária de 50-200 μg de Cr (III) é recomendada para adultos (ATSDR, 2000). Exposições excessivas ao cromo podem causar danos que vão desde problemas nos rins a dermatites, passando por úlceras e câncer. Suspeita-se da sua ligação com disfunções cardíacas e outros problemas (MOREIRA E BOAVENTURA, 2003; FERREIRA, 2002). Não é um elemento cumulativo no organismo humano, e tem uma meia vida biológica de 15 a 41 horas.

O cromo encontra-se no ar como material particulado ($< 20 \mu\text{m}$) com tempo de residência de 10 dias. Sua concentração na atmosfera é da ordem de aproximadamente $0,1 \mu\text{g m}^{-3}$. Em águas a concentração pode chegar a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e em solos os valores variam entre $2 - 60 \text{ mg Kg}^{-1}$. O metal apresenta-se como Cr (III) (geralmente associado a fontes naturais) e Cr (VI) (geralmente associado a fontes antropogênicas) (MOREIRA E BOAVENTURA, 2003). A forma hexavalente apresenta maior toxicidade do que a forma trivalente (FERREIRA, 2002). Alguns autores explicam este fenômeno pela maior facilidade do Cr (VI) em atravessar a membrana celular por formar complexos tetraédricos de estrutura semelhante aos sulfatos (MOREIRA E BOAVENTURA, 2003).

2.4. Chumbo

O chumbo é um metal cinza azulado e o mais maleável dos metais pesados. O chumbo é encontrado na natureza em diferentes minerais, dentre eles destaca-se a galena, PbS. Os compostos do chumbo bivalente são os mais freqüentemente encontrados na natureza (OMS, 1995).

Dentre os metais pesados, o chumbo é um dos mais empregados na indústria, muito utilizado na fabricação de baterias, pigmentos, extrusão a rolo, cabos e munições (ILZSG, 2007).

Os relatos sobre a intoxicação por chumbo vêm da Grécia antiga, onde era utilizado na confecção de taças, dos aqueodutos e de utensílios domésticos. Também era costume a adição de óxidos de chumbo para a correção da acidez do vinho. Hipócrates em 370 a.C. foi quem primeiro descreveu sobre as cólicas saturninas sofridas pelos mineradores (OGA, 1996). Segundo TIMBRELL (1995), o chumbo teria contribuído para o declínio do Império Romano, uma vez que altos teores deste metal foram encontrados nos esqueletos humanos referentes a este período.

O nível de contaminação dos alimentos produzidos próximos às regiões industrializadas é afetado pelas características das indústrias existentes. Os organismos que vivem em ambiente aquático captam e acumulam o chumbo existente na água e nos sedimentos. A carga do contaminante existente nos vegetais é gerada pela captação do metal pelas raízes e pela deposição no vegetal de matéria finamente particulada. O chumbo pode também ser incorporado aos alimentos durante os processos de industrialização, ou no preparo doméstico, especialmente quando são utilizados utensílios de cerâmica, chumbo-cristal ou metálicos (OGA, 1996).

Na introdução pela via oral, a absorção é pequena e ocorre ao nível da mucosa intestinal (intestino delgado), variando com a idade, dieta e tipo de composto ingerido. No adulto, a absorção por esta via varia de 5 a 10% da quantidade de chumbo ingerida, enquanto que na criança esta percentagem pode alcançar até 50%. O mecanismo de absorção do chumbo nesta região não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que ocorra por transporte ativo, regulado pelos mesmos mecanismos que regulam a absorção de íons, tais como cálcio, ferro, magnésio e fósforo. Apesar dos carregadores apresentarem maior afinidade de ligação com o chumbo, uma dieta rica em cálcio irá sempre diminuir a absorção plúmbica, ou seja, a interação entre o chumbo e o cálcio é antagonista no nível da absorção intestinal (OMS, 1995; TIMBRELL, 1995).

Pode-se observar, portanto, que a dieta individual representa um fator importante na absorção do chumbo pelo trato gastrointestinal. Além do cálcio e ferro, outros componentes da alimentação podem alterar a percentagem de absorção do chumbo (MANNAN et al., 1992; CEZARD E MAGUENOER, 1992).

A meia-vida do chumbo no sangue e tecidos moles está na faixa de 36-40 dias para adultos. Os ossos contêm cerca de 90% do conteúdo total de chumbo no organismo, onde a meia-vida é aproximadamente de 2 a 10 anos (TIMBRELL, 1995; CEZARD E MAGUENOER, 1992).

A principal ação tóxica dos compostos inorgânicos de chumbo ocorre na medula óssea onde interferem com a síntese do heme, fração não protéica da hemoglobina e de outras hemoproteínas como o citocromo P450, e a mioglobina. Nessa síntese, o chumbo inibe duas enzimas: o ácido delta amino-levulínico desidratase (δ ALA-D) e a heme sintetase. Existem evidências da inibição da coproporfirina descarboxilase (COPRO-D) e do ácido delta-aminolevulínico sintetase (δ ALA-S) (OMS, 1995).

No sistema nervoso central o chumbo, em elevadas concentrações, pode provocar as chamadas síndromes cerebrais orgânicas (SCO), que se iniciam lentamente com irritabilidade difusa, dificuldade em novos aprendizados, dificuldade de encarar situações novas. No sistema nervoso periférico, o chumbo produz desmielinização e degeneração dos axônios. A velocidade de condução nervosa é afetada por níveis de chumbo no sangue acima de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, em exposições crônicas longas. Os músculos mais ativos são atingidos primeiro, mas geralmente, não há comprometimento da sensibilidade tátil. O mecanismo proposto para esta ação neurotóxica periférica é a destruição da bainha de mielina dos neurônios (TIMBRELL, 1995).

3. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Entre as técnicas disponíveis para a determinação de metais em um número variado de amostras, as mais comuns são a espectrofotometria na região do ultravioleta/visível (UV/Vis), a espectrometria de absorção atômica e de emissão óptica (AAS e OES, respectivamente), a espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), entre outras. A AAS tem como principais características sua especificidade, além da possibilidade de empregar como atomizadores uma chama (FAAS) que normalmente trabalha com concentração de analito na faixa de mg L^{-1} e o forno de grafite (GF AAS), que usualmente determina concentrações na faixa de μg ao ng L^{-1} .

No caso da GF AAS, os principais atrativos são, além de sua especificidade pela utilização de uma fonte de radiação específica para o analito, alta sensibilidade, pequeno volume necessário de amostra (usualmente da ordem de 1 a $100 \mu\text{L}$) e possibilidade de eliminar a matriz diretamente na etapa de pirólise. Esta técnica tem como outra

vantagem sobre as demais o fato de permitir trabalhar com amostras líquidas, sólidas, suspensões e gases (hidretos e vapor frio de mercúrio) (WELZ E SPERLING, 1999).

3.1. Modificadores químicos

Para influenciar os processos que ocorrem no atomizador de modo desejável, na técnica de GF AAS, podem ser empregados reagentes denominados modificadores químicos. Esses são soluções de substâncias adicionadas em conjunto com a amostra no tubo de grafite que auxiliam na retenção do analito em elevadas temperaturas durante a etapa da pirólise, removendo concomitantes da matriz e/ou auxiliando a formação adequada da nuvem atômica do analito.

O termo modificador de matriz foi introduzido em 1974 por EDIGER, PETERSON e KERBER (1974 apud PINTO, 2004) (hoje denominado modificador químico) após a realização de um estudo que tinha como objetivo determinar Pb em água do mar. Essa determinação é prejudicada pois o Pb volatiliza-se em temperaturas acima de 500 °C, e o NaCl só é eliminado em temperaturas acima de 1000 °C. A adição de NH_4NO_3 em excesso (mg L^{-1}) dá início a uma reação espontânea com o NaCl formando NaNO_3 e NH_4Cl , os quais se volatilizam abaixo de 300 °C. Mantendo a temperatura de pirólise em 400 °C, o autor conseguiu eliminar o interferente, sem perdas do analito. A partir deste estudo, centenas de outros têm sido propostos, com substâncias diversas que têm essa função de aumentar a volatilidade da matriz. Por outro lado, o modificador pode atuar também sobre o analito formando um composto com este, que diminua sua volatilidade e, deste modo, permita o uso de temperaturas altas na etapa da pirólise para eliminar interferências da matriz sem perder o analito.

Desde então, um grande número de substâncias químicas têm sido citadas na literatura para atuar como modificador químico. Elementos metálicos como Cu, Ni, La, Pd e Mg, entre outros, têm sido empregados com este propósito. Uma mistura de nitrato de Pd e Mg tem sido recomendada como modificador químico universal para cerca de 21 analitos (WELZ et al, 1992).

Um bom modificador deve ter uma série de características, tais como: estabilizar o analito até pelo menos 1000 °C, ser raramente determinado (para evitar contaminação cruzada), ser o mais universal possível, não diminuir o tempo de vida do tubo de grafite, não causar alta absorção de fundo e não afetar negativamente a sensibilidade. Uma outra alternativa interessante é o uso de modificadores permanentes. Nesse caso, uma determinada massa de modificador é depositada sobre a superfície de grafite e aí fixada por um programa de temperatura específico (CAMPOS, 2000).

3.2. Modificadores permanentes

O termo modificador permanente foi introduzido por SHUTTLE et al. (1992), que depositaram no interior do tubo de grafite 50 µg de Pd + 50 µg de Ir para captar hidretos de As, Bi e Se. Com este tratamento foi possível a obtenção de 300 determinações com o mesmo tubo de grafite.

Modificadores permanentes podem ser obtidos por deposição térmica do metal sobre a superfície da parede do forno ou da plataforma, através de introduções consecutivas de uma solução do reagente modificador no interior do tubo, seguidas de um programa de aquecimento específico. Outra alternativa é a eletrodeposição do elemento. A modificação da plataforma desta última forma (eletrodeposição ou *sputtering*) não é tão eficiente como ocorre com a deposição térmica. Nos processos de

sputtering a superfície do grafite fica completamente coberta com o metal nobre não ficando sítios de carbono ativo disponíveis para promover a redução dos óxidos do analito em átomos livres. Isso inibe a formação de composto intermetálico e/ou solução sólida entre o analito e o metal nobre – modificador aumentando as perdas por volatilização do analito.

Os elementos preferidos para a aplicação como modificador permanente são aqueles do grupo da platina (Pt, Ir, Ru, Rh), além daqueles elementos formadores de carbetos (principalmente Zr, Nb, Ta e W). A escolha por esses elementos leva em conta os seus altos pontos de fusão (entre 2400 e 3300 °C) o que possibilita o uso de elevadas temperaturas de atomização e limpeza sem a perda do modificador, característica do termo permanente. (WELZ e SPERLING, 1999). Entre os principais atrativos do uso de modificador permanente pode-se citar:

- não necessita ser um sal de alta pureza, porque ele será descontaminado durante a deposição, ao contrário do que ocorre com o modificador convencional que é introduzido junto com a amostra;
- curto tempo de programa de temperatura pois não há necessidade da introdução e secagem do modificador;
- menor custo de análise, uma vez que o modificador não é de elevada pureza;
- melhora o limite de detecção, uma vez que ele é limpo “in situ” durante a deposição;
- geralmente atua com maior eficiência na destruição da matriz na etapa de pirólise;
- elimina ou minimiza interferências atenuando a absorção de fundo em relação ao modificador convencional;

- pode permitir a análise de algumas matrizes complexas diretamente sem digestão;
- protege o tubo de grafite, aumentando consideravelmente sua vida útil (SILVA, 2000).

Foi observado que o uso de irídio, de ródio e de suas misturas, na forma de modificador químico permanente, mostrou ser eficiente na determinação de prata, arsênio, bismuto, cádmio e antimônio em amostras certificadas de água e de tecido de ostra, apresentando valores em concordância com os valores certificados (SILVA et al., 1998). Posteriormente, o rutênio foi investigado e se mostrou uma excelente opção para atuar como modificador permanente, mesmo em meios extremamente agressivos ao tubo de grafite como é o caso da água régia, onde o tubo teve uma vida superior a 1800 determinações (SILVA et al., 1999), como também, por outro lado, em meio extremamente básico, que é o caso de amostras biológicas submetidas a solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (SILVA et al., 2003). Tungstênio como modificador permanente foi utilizado na análise de chumbo em amostras de vinagre por OLIVEIRA et al. (2007) com co-injeção de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ obtendo-se uma massa característica e um LOD de 40 pg e $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. FARIÑAS et al. (2007) utilizaram tubos de grafite com plataformas cobertas com alguns modificadoras permanentes (como W, Ir, Ru, W+Ir e W+Ru) que foram comparativamente estudados em relação a misturas comuns de modificadores químicos [$\text{Pd-Mg}(\text{NO}_3)_2$ e $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Mg}(\text{NO}_3)_2$] na determinação de Cd em destilado à base de bagaço de oliva (*orujo spirit samples*), conseguindo-se melhores resultados para W com LOD de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. O não uso de modificador, irídio, rutênio, ródio e zircônio (independentemente, 500 μg) foram testados na determinação de Al, Cd, Cr e Pb em amostras de água potável apresentando melhores resultados para o uso de Rh na

determinação de cádmio e cromo e, para o uso de Zr, na determinação de chumbo e alumínio (PEREIRA et al, 2004). FLORES et al. (2004) demonstraram a potencialidade do uso de Zr na modificação permanente da plataforma de L'Vov, empregada em condições drásticas ($4 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$) na determinação de lítio, com bons resultados de precisão ($\text{RSD} < 9\%$) e exatidão após 480 ciclos de aquecimento.

BARBOSA JR. et al. (2004) determinaram cromo em urina utilizando tubo de grafite modificado por eletrodeposição de tungstênio, obtendo bons resultados e com 800 queimas de vida útil do tubo. Resultados satisfatórios foram obtidos empregando-se rutênio como modificador permanente na determinação direta de cobre e cromo em urina (MAGALHÃES et al., 2002). Para determinação exata de selênio em urina, uma mistura de zircônio e ródio, com co-injeção de ródio, foi aplicada com sucesso (PINTO et al., 2005).

4. Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (MASSART et al., 1998). Conforme o objetivo do estudo, a quimiometria pode ser dividida em algumas áreas muito aplicadas atualmente como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, métodos de inteligência artificial, dentre outras.

É comum em otimizações de técnicas analíticas como GF AAS a necessidade de se avaliar a sensibilidade que é afetada por alguns fatores. Como investigar os efeitos de todos esses fatores minimizando-se o trabalho necessário e o custo dos experimentos?

Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos (NETO et al, 2003).

Planejamentos experimentais são usados para obter um método com características desejáveis de maneira eficiente. Isso significa entender o efeito dos fatores (planejamento fatorial) e modelar a relação entre Y e X (metodologia de superfície de resposta) (MASSART et al., 1998).

4.1. Planejamento Fatorial

Um planejamento fatorial é executado com o interesse em se determinar as variáveis experimentais e as interações entre variáveis que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse.

Após selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema, é preciso avaliar a metodologia experimental (tempo, custo, etc.). As variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento.

Em uma etapa seguinte, deve-se escolher qual planejamento usar para estimar a influência (o efeito) das diferentes variáveis no resultado realizando um número reduzido de experimentos. No estudo de triagem, as interações entre as variáveis (interações principais) e de segunda ordem, obtidas normalmente pelos planejamentos fatoriais completos ou fracionários, são de extrema importância para a compreensão do comportamento do sistema.

4.2. Planejamento fatorial fracionário

O planejamento fatorial completo necessita de 2^k experimentos para sua execução, portanto, sua principal desvantagem é o aumento no número de experimentos que devem ser realizados a cada fator adicionado ao estudo (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Se considerarmos (e observarmos) que os efeitos de altas ordens, principalmente para planejamentos com $k > 4$, são quase sempre não significativos e a realização de ensaios para estimar tais efeitos de interação pode ser irrelevante. Desta maneira, com um número menor de experimentos, é possível obter informações daqueles efeitos mais importantes e retirar, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um fatorial completo. Os planejamentos que apresentam estas características são conhecidos como planejamentos fatoriais fracionários. Enquanto um planejamento fatorial completo com quatro variáveis (2^4) utiliza 16 experimentos, um planejamento fatorial fracionário com o mesmo número de variáveis (2^{4-1}) faz o uso de oito experimentos (fatorial de meia fração).

4.3. Metodologia de superfície de resposta

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados e uma metodologia de análise de superfície de resposta pode ser executada para otimização do experimento. Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou

quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização.

Um planejamento experimental construído para estimar coeficientes, segundo algum modelo aproximado, deve reunir certos critérios desejáveis, sendo os principais: proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos, e fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste (MYERS e MONTGOMERY, 2002).

Os planejamentos composto central, do inglês, “Central Composite Design” (CCD) possivelmente são as classes de planejamentos mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos, visto que apresentam todos os critérios descritos acima, dentre outros (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

4.3.1. Planejamento composto central

Os planejamentos composto central foram apresentados como uma evolução dos planejamentos 3^3 . Outras vantagens, como rotabilidade e blocagem ortogonal, além do pouco número de ensaios, foram obtidas devido à presença das seguintes partes no planejamento:

- 1) um planejamento fatorial completo de dois níveis, podendo ser usado ainda, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis;
- 2) experimentos no ponto central, isto é, $x_i = 0$ para todo i ;
- 3) experimentos nos pontos axiais em que $x_i = \pm \alpha$, com $x_j \neq x_i$, e $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento (MYERS e MONTGOMERY, 2002).

A Figura 1 ilustra os pontos experimentais no sistema de coordenadas definidas pelos eixos x_i .

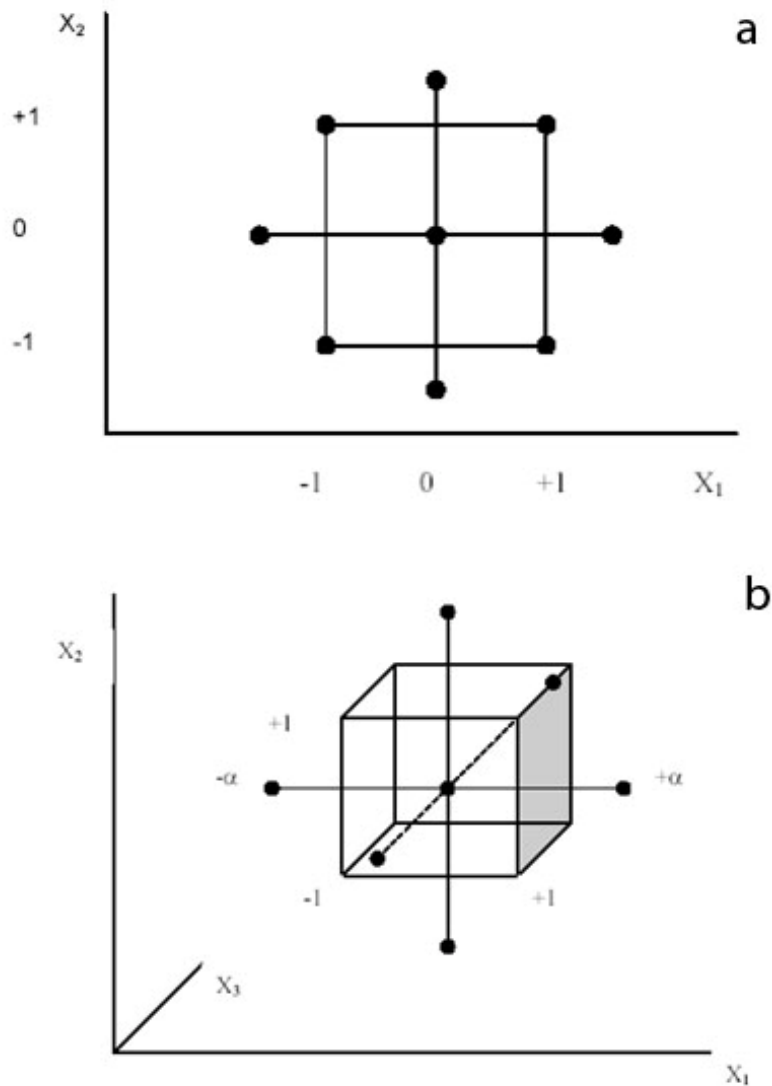


Figura 1 – Planejamentos compostos centrais: (a) dois e (b) três fatores.
Fonte: NETO et al, 2003

Para construção de um planejamento CCD é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas (k), qual planejamento fatorial será empregado (completo 2^k ou fracionário 2^{k-b}) e quantos experimentos serão realizados no ponto central ($2k$). O número de experimentos a ser realizado é dado por 2^k+2k+1 . A Tabela 1 apresenta as matrizes de planejamento para 2 e 3 variáveis.

Tabela 1 – Matrizes dos planejamentos compostos centrais com duas e três variáveis

Planejamento CCD – 2 ²			Planejamento CCD – 2 ³				
x ₁	x ₂		X ₁	x ₂	x ₃		
-1	-1	Planejamento fatorial	-1	-1	-1	Planejamento fatorial	
1	-1		1	-1	-1		
-1	1		-1	1	-1		
1	1		1	1	-1		
0	0	Ponto central	-1	-1	1		
			1	-1	1		
			-1	1	1		
-α	0	Pontos axiais	1	1	1		
α	0						
0	-α			0	0	0	Ponto central
0	α			-α	0	0	Pontos axiais
				α	0	0	
				0	-α	0	
			0	α	0		
			0	0	-α		
			0	0	α		

Fonte: (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Observe que neste tipo de planejamento, os níveis α (o mesmo vale para qualquer valor codificado x_i) necessitam ser decodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis a serem estudadas e para isso utiliza-se a Equação 1:

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\Delta z / 2} \quad (1)$$

em que x_i é o valor codificado do planejamento CCD, z_i o valor experimental do nível, \bar{z} o valor médio entre os níveis mais (+) e menos (-), que é exatamente o valor do nível zero (0) e Δz é a diferença entre os níveis mais (+) e menos (-) (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

5. Validação analítica

Entende-se por validação analítica um conjunto de parâmetros a serem avaliados para comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou usos específicos pretendidos foram atendidos (NBR ISO 9000:2000). Dentre esses parâmetros, chamados *parâmetros de mérito*, destacam-se: linearidade, seletividade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

5.1. Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração (INMETRO, 2003). A linearidade de um método analítico pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear (Equação 2).

$$y = ax + b \quad (2)$$

Onde:

y = resposta medida (absorvância, altura ou área de pico, etc);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração

b = interseção com o eixo y, quando x=0.

A avaliação da linearidade pode ser feita através do coeficiente de correlação linear (r) ou do coeficiente de determinação (R^2). Um R^2 próximo da unidade revela que o método possui uma boa linearidade na faixa de concentração estudada. Valores de R^2 maiores que 0,99 são usualmente requeridos.

5.2. Seletividade – Interferência de matriz

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos e da matriz, que pode possuir interferentes. A seletividade está relacionada ao evento da detecção. Um método que produz respostas para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2003).

A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes, alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque esses compostos afetam diretamente a resposta (INMETRO, 2003).

A curva de calibração aquosa do instrumento, ou seja, com os padrões preparados em água, relaciona a resposta do aparelho com a massa do analito, sem levar em conta a interferência da matriz, já a curva de calibração por adição de analito à matriz visa eliminar interferência da matriz e de outras etapas do método (INMETRO, 2003).

O efeito da matriz pode ser testado comparando-se as inclinações das curvas de calibração do instrumento, sem a matriz (aquosa), com a curva de calibração por adição de analito à matriz. O INMETRO recomenda curvas de calibração com sete pontos igualmente espaçados entre si. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem estatisticamente iguais pode se dizer que não há efeito de matriz considerável.

O teste é realizado construindo-se três curvas de calibração aquosa e três curvas de calibração por ajuste de matriz, com leituras em triplicata. A análise dos dados consiste em aplicar um teste F , para verificar se as variâncias das inclinações podem ser consideradas estatisticamente iguais, pela Equação 3:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (3)$$

onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias de cada inclinação, com a maior variância no numerador.

Ao mesmo tempo, obtém-se o valor de F tabelado, com (n_1-1) graus de liberdade no numerador e (n_2-1) graus de liberdade no denominador; usualmente, adota-se um nível de confiança de 95%. Têm-se dois casos:

(I) se o F calculado $<$ F tabelado, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Nesse caso, os desvios-padrões dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student, pela aplicação das Equações 4 e 5:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (4)$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (5)$$

Onde:

\bar{x}_1 e \bar{x}_2 = médias das inclinações dos dois tipos de curvas (aquosa e ajuste de matriz)

na mesma faixa de concentração,

s_1^2 e s_2^2 = variâncias das inclinações dos dois tipos de curvas e

$n_1 = n_2 = 3$ (três curvas, três inclinações).

O valor de t_{tabelado} é obtido a partir da tabela da distribuição de Student para ($n_1 + n_2 - 2$) graus de liberdade e a confiança desejada. Para avaliação basta comparar os valores de t ; se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ significa que as inclinações dos dois tipos de curvas são estatisticamente iguais e não há efeito de matriz considerável, caso contrario, há efeito de matriz. Quando não houver efeito de matriz considerável toda a determinação do analito pode ser feita com calibração aquosa.

(II) se o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo e as variâncias podem ser consideradas diferentes. Sendo assim, o efeito de matriz é responsável pela diferença de precisão entre os dados dos dois tipos de curvas. Logo, pode se considerar que há efeito de matriz e a calibração por ajuste de matriz deve ser utilizada.

5.3. Limite de detecção

Limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (SKOOG, 2002).

No caso de técnicas instrumentais (HPLC, GC, AAS), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003). Pode ser determinado pela Equação 6 (ANVISA, 2003):

$$LOD = \frac{3xS}{a} \quad (6)$$

Onde:

S = desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do primeiro ponto da curva de calibração por adição de analito à matriz;

a = é a inclinação da curva de calibração.

5.4. Limite de quantificação

Limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (SKOOG, 2002). Pode ser expresso pela Equação 7 (ANVISA, 2003):

$$LOQ = \frac{10xS}{a} \quad (7)$$

Onde:

S = desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do primeiro ponto da curva de calibração por adição de analito à matriz;

a = inclinação da curva de calibração.

5.5. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade do método é verificada por no mínimo três concentrações, baixa, média e alta, contemplando o intervalo linear do método, realizando-se sete determinações por concentração. A precisão deve ser determinada em ensaios efetuados em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em no mínimo três dias diferentes (precisão inter-ensaio).

A precisão intra-ensaio pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 8:

$$CV\%_{\text{intra-ensaio}} = \frac{s}{\bar{C}} \times 100 \quad (8)$$

onde:

s = desvio padrão das concentrações de sete determinações feitas num mesmo dia;

\bar{C} = concentração média determinada.

A precisão inter-ensaio é calculada de forma semelhante (Equação 9), porém o desvio padrão é calculado a partir de três valores (médias dos três dias de análise) totalizando um número de 21 determinações ($n=21$).

$$CV\%_{\text{inter-ensaio}} = \frac{s}{\bar{\bar{C}}} \times 100 \quad (9)$$

onde:

s = desvio padrão das médias das concentrações de três dias diferentes;

$\bar{\bar{C}}$ = concentração média determinada entre três dias.

Os limites aceitáveis variam de acordo com a concentração: 100 ppb – 15%; 20 ppb – 21% e 1 ppb – 30% (AOAC, 1993).

5.6. Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) (INMETRO, 2003).

A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global (INMETRO, 2003).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realizações de ensaios de recuperação (INMETRO, 2003).

5.6.1. Materiais de referência certificados

Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um material de referência certificado (MRC) possui um valor de concentração e uma incerteza associada. É muito

importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis (INMETRO, 2003).

O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las, dependendo do rigor definido para os resultados (INMETRO, 2003).

5.6.2. Recuperação

O guia EURACHEM (1998) define recuperação como “*a fração do analito adicionada a uma amostra teste antes da análise*”. Tendo analisado amostras fortificadas e não fortificadas, a porcentagem de recuperação é calculada como se segue (Equação 10):

$$Recuperação (\%) = \left(\frac{CF - CU}{CA} \right) \times 100 \quad (10)$$

Onde:

CF = concentração do analito na amostra fortificada;

CU = concentração do analito na amostra não fortificada;

CA = concentração do analito adicionada (concentração teórica).

6. Materiais e métodos

6.1. Material

6.1.1. Equipamentos e acessórios

Foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), modelo SpectrAA - Zeeman 220, da Varian[®] (Victoria, Austrália), equipado com amostrador automático (PSD – EL 98013384 ZC) e corretor de fundo Zeeman, todos da Varian[®], localizado na Faculdade de Farmácia, Laboratório de Toxicologia Ocupacional. Em todas as análises por GF AAS foi utilizado como gás de purga o argônio N50 da Air Liquide[®] (Contagem, MG, Brazil), com grau de pureza de 99,999%. Como solução de lavagem do amostrador automático foi utilizado Triton X-100 0,1% (v/v) em ácido nítrico 0,2% (v/v) para limpar e evitar a adsorção de analitos na superfície do frasco e entupimento no capilar do amostrador. Também foram utilizadas micropipetas reguláveis de 20 a 200 µL e 100 a 1000 µL da Thermo scientific/Finnpipette[®] (Vantaa, Finlândia) empregadas no preparo de soluções. Apesar do fabricante do espectrômetro recomendar leituras em altura de pico para os quatro metais analisados, no caso de cromo e cobre foi possível utilizar leituras em área de pico (a sensibilidade em altura e área foram semelhantes). Para chumbo e manganês as medidas foram realizadas em altura de pico. Lâmpadas de catodo oco mono-elementares de Cr, Cu e Mn da IST (Imaging & Sensing Technology, Horseheads, NY) e de Pb da Varian foram utilizadas, operando conforme Tabela 2. Tubos de grafite pirolítico da Varian com e sem plataforma (63-100023-00 e 63-100024-00 – tubo com plataforma e 63-100012-00 tubo sem plataforma, Alemanha) foram usados em todos os estudos.

Tabela 2 – Parâmetros instrumentais e condições operacionais para o GF AAS

Parâmetro	Mn	Cu	Cr	Pb
Comprimento de onda (nm)	279,5	327,4	357,9	283,3
Fenda (nm)	0,2	0,5	0,5R*	0,5
Corrente (mA)	15	10	7	10

*R quer dizer que a altura da fenda é reduzida

6.1.2. Reagentes e vidraria

Ácido Nítrico 65% m/m Suprapur® da Merck (Darmstadt, Germany) foi usado. Soluções de hidroximetilaminometano (TRIS) a 80% v/v e monoetanolamina (MEA) a 20% v/v foram preparadas a partir de diluição apropriada dos reagentes puros da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil), com posterior ajuste do pH para 8 (pH em que não ocorre corrosão do tubo de grafite) com ácido cítrico p.a. da Cinética Reagentes e Soluções (São Paulo, SP, Brazil). Soluções de referência para calibração foram feitas partindo de soluções padrão estoque de cada metal na concentração de $1000 \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ (Titrisol – Merck) em HNO_3 5% v/v.

Para os modificadores, soluções padrões de W, Rh, Ir, Ru e Pd a 1000 mg L^{-1} (Titrisol – Merck), e soluções de Ti, Nb ou Ta a 1000 mg L^{-1} , preparadas a partir dos sais, foram usadas.

Solução de limpeza do amostrador automático preparada para conter 0,1% (v/v) de Triton X-100 (Merck) em 0,2% (v/v) de ácido nítrico foi usada para evitar entupimento do capilar do amostrador devido à adsorção do analito e da matriz.

Toda vidraria utilizada na otimização, validação e determinação dos elementos em leite materno foi previamente submetida a descontaminação em solução de ácido nítrico

20% v/v, por no mínimo 24h e posteriormente enxaguada, no mínimo três vezes, com água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

6.1.3. Materiais de referência

Material de referência certificado Infant formula NIST[®] 1846 foi utilizado para verificar a exatidão nas análises de cobre e manganês, enquanto que para chumbo, sangue certificado da Bio - Rad (Laboratories, Lyphochek[®] - Metals Blood Control, Irvine, CA, USA) foi usado. Para cromo, urina certificada da Bio - Rad Laboratories (Lyphochek[®] - Metals Urine Control - 69081, Irvine, CA, USA) foi utilizada como material de referência certificado.

6.2. Tratamento do tubo de grafite com modificadores permanentes

As plataformas de L'vov (Figura 2) foram tratadas com tungstênio, ródio, irídio, rutênio, tântalo, titânio e nióbio como modificadores permanentes. O tratamento consistiu em aplicar sobre a plataforma do forno de grafite 40 µL de solução 1,0 g L⁻¹ do metal com posterior aquecimento do forno de grafite em um programa de tratamento específico (Tabela 3). Sendo este procedimento repetido por 13 vezes, totalizando 520 µg do metal, seguido por 13 injeções de 40 µL de água deionizada para limpeza *in situ* da plataforma (SILVA et al., 1998; SILVA et al., 1999).

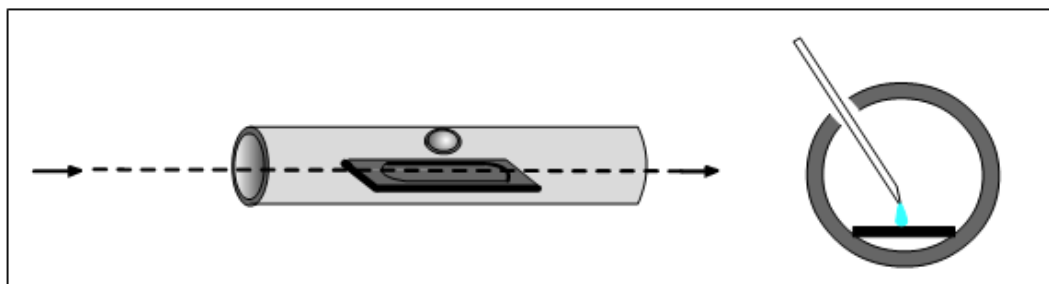


Figura 2 – Vista de um tubo com plataforma de L'vov no momento da deposição de uma solução.

Tabela 3 – Programa de temperatura do forno para tratamento da plataforma de grafite com modificadores permanentes

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)	Estágios
1	50	10,0	-	3,0	Secagem
2	95	20,0	-	3,0	
3	120	10,0	-	3,0	
4	1000	5,0	20,0	3,0	Pirólise
5	2000	1,0	0,1	0	Atomização
6	2000	-	2,0	3,0	Limpeza

6.3. Amostras e tratamento de amostras

Amostras de leite materno foram obtidas em parceria com a Maternidade Odete Valadares (Belo Horizonte, MG). As amostras foram coletadas e estocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidas em freezer a -10°C. Antes do uso as amostras foram retiradas do freezer para atingirem a temperatura ambiente. O único tratamento das amostras foram diluições com reagentes apropriados, abaixo descritas.

As diluições foram de 1:1 para as análises de cromo, chumbo e manganês e de 1:10 para as análises de cobre.

SANTOS et al. (2002) desenvolveram uma alternativa aos procedimentos para estabilização das suspensões de leite usando o reagente CFA-C, uma mistura de aminas terciárias sendo o MEA e o TRIS seus principais componentes, (NÓBREGA et al., 1997; MCKINSTRY et al., 1999) e Triton X-100 (HUA et al., 2000). Neste estudo foram propostas duas misturas: monoetanolamina (MEA) + ácido cítrico e hidroximetilaminometano (TRIS) + ácido cítrico. Uma vantagem do uso desses reagentes é o menor custo comparativamente à mistura comercial de aminas. Estes reagentes e concentrações foram selecionados com base nos trabalhos de SANTOS, 2002.

Uma amostra foi aleatoriamente selecionada para os estudos de otimização e validação dos métodos (amostra referência).

7. Estratégia de otimização das condições analíticas

A otimização das condições analíticas para todos os metais analisados foi semelhante. Amostras diluídas de acordo com o item 7.3 foram preparadas e adicionadas do analito para uma concentração recomendada pelo fabricante para gerar uma absorvância próxima de 0,2 unidades (cada analito requer uma concentração diferente, esta concentração será indicada quando da discussão dos resultados).

Em primeiro lugar, temperaturas e tempos de secagem foram otimizados, partindo-se das condições recomendadas pelo fabricante, até que não fosse observado borbulhamento da amostra dentro do forno de grafite. A secagem deve ser efetiva para se evitar perdas do analito, obstrução da passagem da radiação eletromagnética (por

presença de gotículas da amostra nas lentes) além de evitar a corrosão do equipamento por projeção de gotículas da amostra nas partes metálicas do equipamento.

Em seguida, foram realizados testes com modificadores permanentes (para o chumbo a co-injeção de modificador químico em solução também foi avaliada) bem como a condição sem modificador usando as condições recomendadas pelo fabricante do equipamento para escolha de dois modificadores (para serem utilizados em um planejamento fatorial fracionário de dois níveis) que apresentassem melhor desempenho (maior sensibilidade, menores absorção de fundo e adequado desvio padrão relativo de triplicatas de leitura).

A partir de então, planejamentos fatoriais fracionados (2^{4-1}) foram realizados para avaliação preliminar das variáveis temperaturas de pirólise e atomização, tempo de pirólise e modificador. Por fim, as variáveis numéricas que foram significativas na avaliação preliminar foram refinadas em planejamentos composto central para determinação das condições ótimas.

Os dados experimentais foram processados usando o programa de computador STATISTICA 6.0 para Windows (StaSoft, 2001).

8. Estratégias de Validação

8.1. Procedimentos

Os procedimentos adotados para validação são mostrados a seguir:

- a. Foi preparada uma curva de calibração aquosa em HNO_3 2% v/v e uma curva por ajuste de matriz, utilizando a amostra referência, seguindo as diluições propostas para cada analito conforme descrito no item 7.3. As

curvas foram preparadas de forma a conter sete pontos igualmente espaçados entre si, como por exemplo, 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$;

- b. Foram preparadas sete soluções do menor ponto da curva de calibração por ajuste de matriz + sete soluções de um valor intermediário + sete soluções de um valor alto todos dentro da curva de calibração. Os valores de concentração destas soluções foram igualmente espaçados entre si, como por exemplo, em uma curva de calibração de 0 a 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ os valores de concentração seriam 0,5; 1,5 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$;
- c. Foram preparadas três soluções do branco da amostra referência.
- d. Para o material de referência certificado disponível, foi feita diluição apropriada para obter uma concentração próxima ao centro da curva de calibração;
- e. Foram repetidos os itens de *a)* a *c)* por mais duas vezes, sendo que na terceira repetição o menor ponto da curva foi preparado dez vezes de forma que o desvio das medidas foi utilizado nos cálculos dos limites de detecção e quantificação.

As leituras foram feitas em ordem aleatória para evitar erros sistemáticos principalmente devido à perda de sensibilidade do tubo de grafite durante a análise. Apenas os três brancos da amostra referência foram lidos em ordem especificada (início, meio e fim da análise).

8.2. Cálculo dos parâmetros de mérito

Foram calculados a média e o desvio padrão das inclinações das curvas de calibração dos três dias. Os valores foram comparados utilizando testes estatísticos F e t de Student a fim de verificar uma possível diferença estatística entre as inclinações para um nível de confiança de 95%. Sem diferença significativa, conclui-se que não há efeito de matriz considerável e adota-se a curva de calibração aquosa para cálculo dos outros parâmetros de mérito. Caso contrário, a curva por ajuste de matriz deve ser utilizada.

Com as absorvâncias das sete soluções nos três níveis avaliados no primeiro dia, foram realizados os cálculos das recuperações e respectivos desvios padrão de acordo com o item 6.6.2. Com os mesmos dados foram calculadas as precisões intra-ensaio de acordo com o item 6.5 sempre descontando a absorvância média dos três brancos preparados.

Com os dados do segundo e terceiro dia foram calculadas as concentrações médias de cada nível avaliado para estimar a precisão inter-ensaio (item 6.5). Com os valores de absorvância das dez soluções do menor ponto da curva de calibração, foram calculados os limites de detecção e quantificação utilizando as fórmulas descritas nos itens 6.3 e 6.4.

9. Resultados e discussão

9.1. Determinação de Mn em leite materno por GF AAS

Aleatoriamente uma amostra (amostra referência) de leite materno foi selecionada para otimização e validação do método. Para a otimização esta amostra foi diluída 1:1

com solução de TRIS 80% v/v ou MEA 40% v/v e adicionada de manganês para uma concentração final de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentração indicada pelo fabricante do equipamento para gerar um sinal analítico de aproximadamente 0,2 unidades de absorvância medidas em altura). A mistura resultante, tanto para MEA como para TRIS foi uma suspensão homogênea até 20 minutos. Assim, após esse tempo as soluções foram homogeneizadas novamente (agitação com micropipeta de volume fixo de $500 \mu\text{L}$).

Apesar do conceito forno plataforma de temperatura estabilizada (STPF) indicar que melhores resultados são obtidos quando se realizam medidas em absorvância integrada (área de pico), no equipamento da Varian (SperctrAA Zeeman-220) alguns elementos, como o manganês, são melhores determinados em altura de pico. Isto acontece porque neste equipamento o sinal analítico (pico) é muito simétrico (largura de 0,5 a 1,5 segundos) fazendo com que as medidas em altura sejam muito maiores que em área de pico.

Para otimização, validação e análise de Mn no leite materno o volume injetado dentro do forno de grafite foi sempre de $20 \mu\text{L}$.

9.1.1. Otimização das condições analíticas

Para o desenvolvimento do método de análise de manganês, dois diluentes foram testados sendo eles TRIS 80% v/v e MEA 20% v/v. Para cada diluente toda a otimização das condições analíticas foi feita e ao final, aquele que permitiu uma melhor exatidão do método, quando testado com material certificado, foi escolhido para a validação e determinação de Mn nas amostras.

Em primeiro lugar, temperaturas e tempos de secagem foram otimizados para cada suspensão obtida da amostra referência (soluções com diferentes diluentes) partindo-se

das condições recomendadas pelo fabricante, até não se observar borbulhamento da amostra dentro do forno de grafite.

Em seguida, para cada diluente utilizado, foi feita uma seleção do tipo de tubo de grafite a ser usado dentre tubos com modificadores químicos permanentes (tubos com plataformas de L'vov tratadas com W, Rh, Ru e Ir) e tubos com modificadores químicos em solução (co-injeção de 5 μL de Pd), e tubo sem modificador (tubo sem plataforma), utilizando o programa de aquecimento do forno recomendado pelo fabricante (Tabela 4). Foram selecionados como os dois melhores tipos de tubo de grafite, aqueles que apresentaram maior sinal analítico, menor sinal de fundo e menor desvio padrão relativo entre as triplicatas de leitura da amostra referência (Tabelas 5 e 6). Os modificadores que apresentaram maior absorvância, sinal de fundo corrigido e menor desvio padrão relativo foram Pd em solução e a condição sem modificador para ambos os diluentes (Tabelas 5 e 6).

Tabela 4 - Programa aquecimento recomendado pelo fabricante para análise de Mn por GF AAS

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
1	85	5,0	-	3,0
2	95	40,0	-	3,0
3	120	10,0	-	3,0
4	700	5,0	3,0	3,0
5	2400	0,9	2,0	0,0
6	2400	-	2,0	3,0

Tabela 5 – Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Mn em leite materno utilizando TRIS como diluente

TRIS	Absorvância (altura)			Fundo	Abs média	%RSD
W	0,0498	0,0708	0,0579	0,3311	0,0595	18
Ir	0,0115	0,0089	0,0103	0,0022	0,0102	13
Rh	0,0047	0,0085	0,0090	-0,0345	0,0074	32
Ru	0,0125	0,0058	0,0044	0,0106	0,0076	57
Pd solução	0,1576	0,1500	0,1467	0,0160	0,1514	4
Sem modif.	0,1505	0,1476	0,1523	0,0373	0,1501	2

Tabela 6 – Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Mn em leite materno utilizando MEA como diluente

MEA	Absorvância (altura)			Fundo	Abs média	%RSD
W	0,0412	0,0622	0,0515	0,2977	0,0517	20
Ir	0,0095	0,0069	0,0083	0,0021	0,0082	16
Rh	0,0065	0,0070	0,0075	-0,0299	0,0070	7
Ru	0,0034	0,0043	0,0029	0,0086	0,0035	20
Pd em solução	0,1273	0,1197	0,1164	0,0139	0,1211	5
Sem modif.	0,1205	0,1176	0,1223	0,0324	0,1201	2

Assim, um planejamento fatorial fracionado (Tabela 7) foi empregado para avaliar o efeito das variáveis estudadas. Os níveis alto e baixo para as variáveis de

temperatura e tempo de pirólise foram selecionados de acordo com os valores indicados pelo fabricante (nível baixo) e pela complexidade da matriz (nível alto) para ocorrer uma eficiente correção de fundo. A matriz de experimentos e as absorvâncias obtidas no planejamento fatorial para os dois diluentes estão mostradas na Tabela 7.

A avaliação deste planejamento utilizando MEA como diluente mostrou que todas as variáveis estudadas, bem como todas as possíveis interações entre elas produziram algum efeito significativo no valor de absorvância, para 95 % de confiança nos níveis estudados. Já quando foi utilizado TRIS, como diluente, o tempo de pirólise e as interações entre temperatura e tempo de pirólise e entre as temperaturas de pirólise e atomização não foram significativas, como pode ser visto nos gráficos de Pareto mostrados nas Figuras 3 e 4. Os valores positivos para os efeitos indicam que com o aumento da variável em questão há um aumento no valor da absorvância. Os gráficos de Pareto mostram que quando foi utilizado MEA como diluente o melhor modificador é o Pd (nível alto), enquanto que para o TRIS o melhor é o não uso de modificador (nível baixo).

Tabela 7 - Matriz de planejamento fatorial e absorvâncias obtidas para otimização das variáveis para análise de Mn em leite materno utilizando TRIS e MEA como diluentes

Exp.	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Modificador	Abs (altura)	
					MEA	TRIS
1	900 (-)	10 (-)	2200 (-)	Sem (-)	0,1020	0,1171
2	1400 (+)	10 (-)	2200 (-)	Pd (+)	0,1557	0,1140
3	900 (-)	20 (+)	2200 (-)	Pd (+)	0,1312	0,1034
4	1400 (+)	20 (+)	2200 (-)	Sem (-)	0,0957	0,1144
5	900 (-)	10 (-)	2500 (+)	Pd (+)	0,3326	0,0890
6	1400 (+)	10 (-)	2500 (+)	Sem (-)	0,1957	0,1026
7	900 (-)	20 (+)	2500 (+)	Sem (-)	0,3201	0,1026
8	1400 (+)	20 (+)	2500 (+)	Pd (+)	0,3053	0,0982

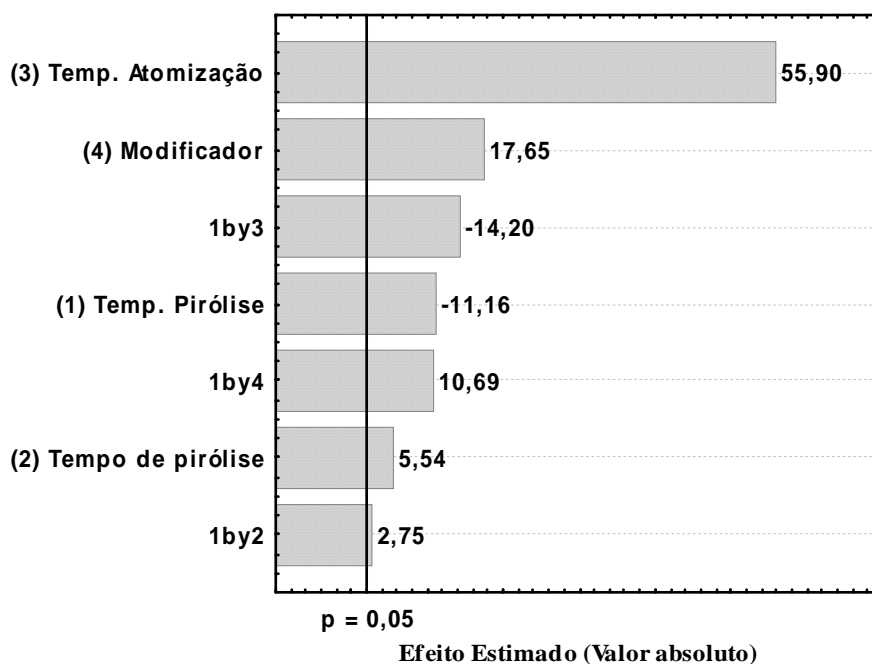


Figura 3 – Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando MEA como diluente na análise de Mn (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9942$).

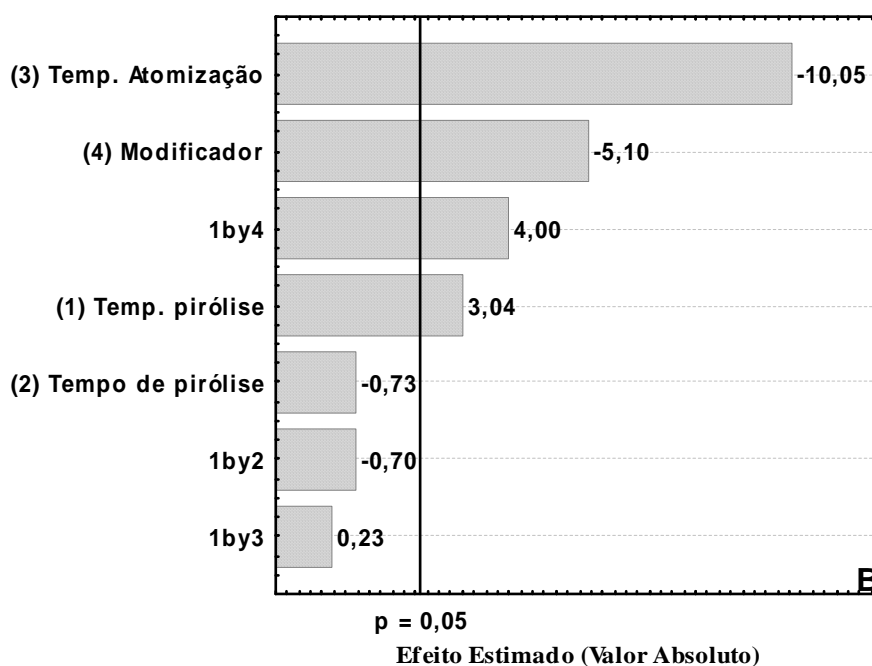


Figura 4 - Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Mn (coeficiente de ajuste do modelo $R = (0,8692)$).

O planejamento fatorial indica ainda a tendência observada para cada variável. No caso do diluente MEA quando foi utilizado o nível alto (efeito positivo) para temperatura de atomização, 2500 °C, o nível baixo (efeito negativo) para temperatura de

pirólise, 900°C, e o nível alto para tempo de pirólise, 20s, os ganhos em sensibilidade foram significativos. Para o diluente TRIS os ganhos em sensibilidade foram significativos quando foi utilizado o nível baixo para temperatura de atomização, 2200 °C e o nível alto para temperatura de pirólise, 1400°C. Considerando os resultados do planejamento fatorial, foi feito um planejamento composto central (CCD) para cada diluente analisado para determinar as condições ótimas das variáveis numéricas significativas. O ponto central deste planejamento foi escolhido observando-se as tendências indicadas pelo planejamento fatorial. Para MEA o modificador utilizado foi Pd em solução e as variáveis otimizadas foram tempo de pirólise e temperaturas de pirólise e atomização. Para TRIS não foi utilizado modificador e as variáveis otimizadas foram apenas as temperaturas de pirólise e atomização, uma vez que o tempo de pirólise não foi significativo quando avaliado pelo planejamento fatorial. As matrizes destes planejamentos estão resumidas nas Tabelas 8 e 9.

A análise deste planejamento mostrou que, para o diluente MEA, nos níveis estudados, somente a temperatura de atomização foi significativa indicando que valores mais altos desta variável produzem maiores valores de absorvância (Figura 5). Desta forma, foram utilizadas as seguintes condições analíticas para este diluente: para a temperatura de pirólise e tempo de pirólise foram escolhidos valores intermediários ligeiramente maiores àqueles utilizados no planejamento CCD, 1000°C e 20s, respectivamente, para a temperatura de atomização, 2700°C e modificador Pd em solução. Os valores intermediários para temperatura e tempo de pirólise foram escolhidos, por fornecerem um menor sinal de fundo do que os obtidos pelos menores valores analisados.

Tabela 8 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Mn em leite materno utilizando o diluente MEA

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)	Tempo de pirólise (s)	Abs (altura)
1	800	2300	15	0,1838
2	800	2700	15	0,3739
3	800	2300	25	0,1745
4	800	2700	25	0,3787
5	1000	2300	15	0,1730
6	1000	2700	15	0,3416
7	1000	2300	25	0,1647
8	1000	2700	25	0,7319
9	732	2500	20	0,3149
10	1068	2500	20	0,2707
11	900	2500	12	0,2931
12	900	2500	28	0,1557
13	900	2164	20	0,1091
14	900	2800	20	0,5064
15 (PC)*	900	2500	20	0,2945**

*PC = ponto central (n = 5), ** Valor médio

Tabela 9 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Mn em leite materno utilizando o diluente TRIS

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)	Abs (altura)
1	1200	2200	0,1027
2	1200	2600	0,2638
3	1600	2200	0,0614
4	1600	2600	0,2433
5	1117	2400	0,2036
6	1683	2400	0,1061
7	1400	2117	0,0523
8	1400	2663	0,2764
9 (PC)*	1400	2400	0,2242

*PC = ponto central (n = 5)

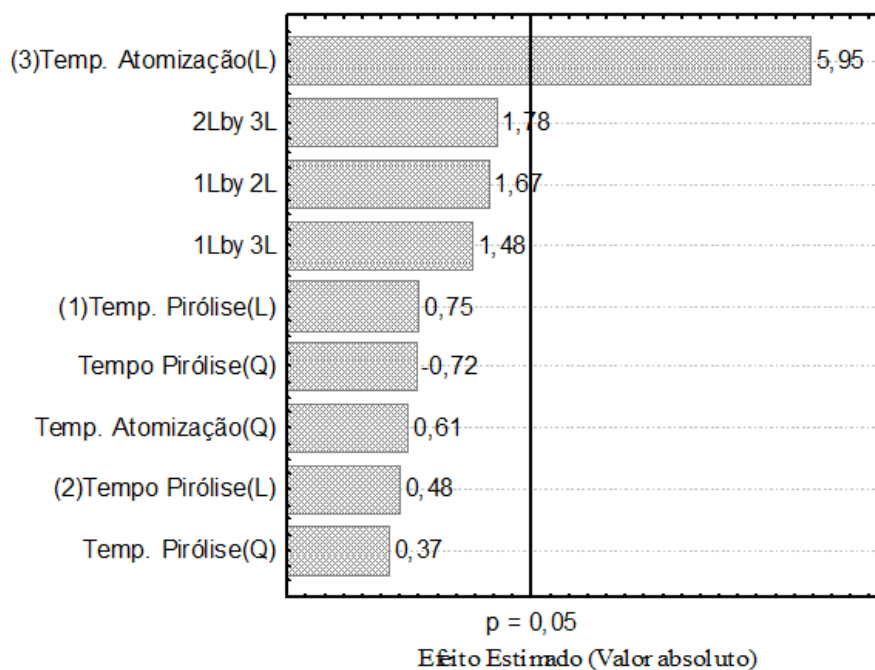


Figura 5 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central utilizando MEA como diluente na análise de Mn (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).

Para o diluente TRIS, as duas variáveis analisadas foram significativas (Figura 6) e a análise da superfície de resposta gerada pelo CCD (Figura 7) mostrou que os valores ótimos para temperatura de pirólise e atomização são 1347°C e 2691°C, respectivamente. Como o tempo de pirólise não foi significativo, foi escolhido o menor valor analisado pelo planejamento fatorial (10s).

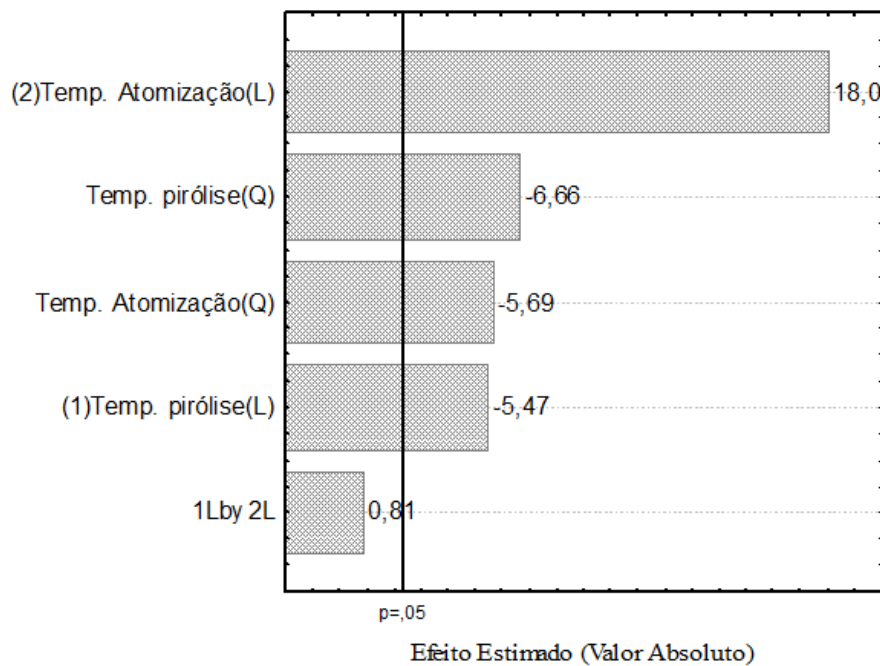


Figura 6 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central utilizando TRIS como diluente na análise de Mn (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).

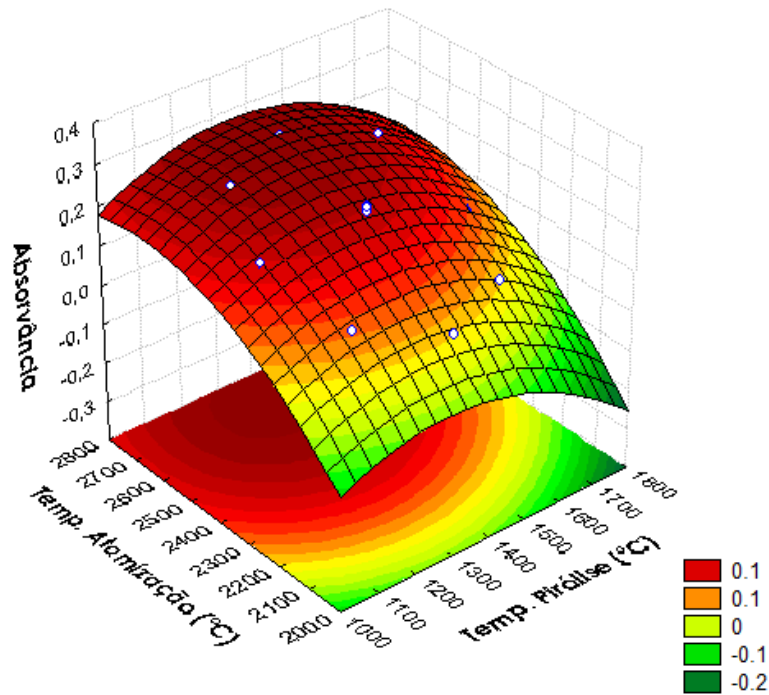


Figura 7 - Superfície de resposta gerada pelo planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Mn.

A Tabela 10 nos mostra os programas de aquecimento de forno otimizados para cada diluente. Nas condições analíticas otimizadas a avaliação do número de queimas que o tubo de grafite suporta não foram feitas porém, pode-se inferir que este número não seja muito grande devido às altas temperaturas utilizadas e o não uso de modificador permanente.

Tabela 10 - Programas de aquecimento de forno otimizados para análise de Mn em leite materno utilizando TRIS ou MEA como diluentes (valores entre parênteses referem-se às condições ótimas para MEA)

Etapa		Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
Secagem	1	85	5,0	-	3,0
Secagem	2	95	10,0	-	3,0
Secagem	3	200	40,0	-	3,0
Pirólise	4	1350 (1000)	5,0	11,0 (21,0)	3,0
Atomização	5*	2690 (2700)	0,5	2,0	0,0
	6	2700	-	2,0	3,0

*A leitura ocorre nesta etapa

9.1.2. Validação da metodologia para análise de Mn em leite materno por GF AAS

Usando o programa de aquecimento de forno com as temperaturas e tempos otimizados (Tabela 10), foi construída uma curva de calibração por ajuste de matriz em cada um dos diluentes analisados e foi feita a leitura da solução de material de referência certificado (Infant formula NIST[®] 1846). Os pontos das curvas por ajuste de matriz foram construídos por diluição 1:1 (cinco partes de leite para cinco do diluente, reservando uma parte do diluente para adição do analito). A Tabela 11 nos mostra o resultado da exatidão para os dois diluentes utilizados com resultado satisfatório apenas para o TRIS, num intervalo de confiança de 95%. Assim, para todos os estudos posteriores foi utilizado o TRIS como diluente.

Tabela 11 – Resultados obtidos para Mn após determinação no SRM NIST 1846 por GF AAS em cada diluente

Diluentes	Valores determinados (mg kg⁻¹)	Valor certificado (mg kg⁻¹)
MEA	0,22 ± 0,04*	0,40
TRIS	0,40 ± 0,04*	

*Intervalo de confiança de 95%

A Figura 8 nos mostra as curvas de calibração média (n=3) em água e por ajuste de matriz utilizando TRIS como diluente, bem como as equações das retas de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos. O método apresentou resposta linear às concentrações de manganês compreendidas na faixa de 0 a 6.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. Foi feita a análise estatística comparando as inclinações das curvas obtidas, utilizando teste F e teste t de Student, como descrito no item 6.2, e o resultado nos mostra que não há diferença significativa entre as mesmas para o intervalo de confiança de 95% (Tabela 12). Assim, todos os estudos posteriores foram feitos utilizando-se calibração aquosa.

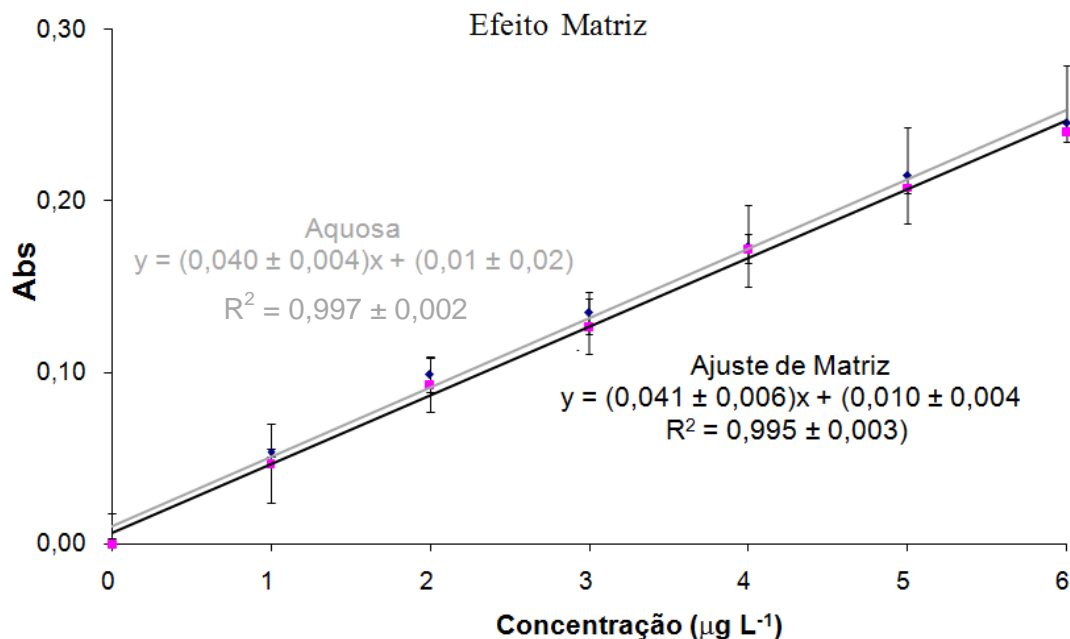


Figura 8 – Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias (n=3) para estudo do efeito de matriz na análise de Mn em leite materno.

Tabela 12 – Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Mn em leite materno

	Calculado	Tabelado
F	3,10	19,0
t	0,01	2,78

Intervalo de confiança de 95%

A validação foi feita de acordo com o item 9. Os limites de detecção e quantificação definidos pelas equações $LOD = 3S/b$ e $LOQ = 10S/b$, foram de $0,28 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,95 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites de detecção dependem da complexidade da matriz, na literatura foi encontrado valores de $0,23 \mu\text{g L}^{-1}$ para medicamentos anti-hipertensivos (SILVEIRA et al., 2007) e $4 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras mais complexas como sedimentos marinhos (PEREIRA, 2008) para determinações de manganês por GF AAS.

A precisão intra-ensaio foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD) de sete replicatas de soluções adicionadas de $1, 3$ e $5 \mu\text{g L}^{-1}$. A média do RSD para a

precisão intra-ensaio foi de $(3 \pm 3) \%$. A precisão inter-ensaio foi avaliada pelo RSD de soluções adicionadas nas mesmas concentrações em três dias consecutivos, apresentando média de $(6 \pm 4) \%$. A massa característica determinada foi de $(1,9 \pm 0,2)$ pg e foi calculada por meio dos dados de uma curva de calibração. As principais figuras de mérito estão resumidas na tabela 7. A exatidão também foi avaliada por meio de estudos de adição-recuperação em soluções adicionadas de 1, 3 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. As recuperações mostraram resultados que variaram de 89 a 107 %. Os resultados da precisão e recuperação para cada nível de concentração estão mostrados na Tabela 13 e os demais parâmetros de mérito na Tabela 14.

Tabela 13 - Resultados para precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Mn

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão intra-ensaio (%) (n = 7)	Precisão inter-ensaio (%) (n = 7, por nível por dia)	Recuperação (%) (n = 7)
1	6,6	2,0	107 \pm 12
3	1,1	7,0	89 \pm 6
5	2,3	10,0	105 \pm 2

Tabela 14 - Parâmetros de mérito para análise de manganês em leite materno

Parâmetro	Valor
Equação da Regressão Linear (n = 3)	Abs = $(0,040 \pm 0,004)C_{\text{Mn}} + (0,01 \pm 0,02)$
R^2 (n = 3)	0,997 \pm 0,002
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0 – 6
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,28
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,95
Massa característica (pg)*	1,9 \pm 0,2

*Valor recomendado = 0,6 pg

Como toda a otimização das condições analíticas foi feita usando a matriz leite materno, valores mais elevados de temperatura de pirólise foram utilizados e portanto, a massa característica determinada para o método proposto foi maior que a

recomendada pelo fabricante do equipamento (1,9 pg contra 0,6 pg). A massa característica recomendada pelo fabricante refere-se a matriz aquosa, portanto, menor temperatura de pirólise é requerida (700°C) o que diminui as perdas nesta etapa do processo de análise diminuindo a massa característica.

9.1.3. Determinação de manganês em amostras de leite materno por GF AAS

As amostras foram diluídas 1:1 com solução de TRIS 80% v/v, pH ajustado para 8, e lidas contra uma curva de calibração aquosa. Na Tabela 15 estão apresentados os níveis de manganês determinados em leite materno de seis amostras colhidas junto à Maternidade Odete Valadares (Belo Horizonte, Brasil). As concentrações de manganês nestas amostras variaram de 1,58 a 21,33 $\mu\text{g L}^{-1}$. Considerando que a absorção oral de manganês é baixa, 3 a 5% da quantidade ingerida, e sua eliminação do organismo é rápida ($t_{1/2} = 37$ dias), os níveis de Mn nas amostras analisadas não são preocupantes (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Tabela 15 - Concentração de manganês em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor \pm desvio padrão) (n = 3)

Amostra	Valor ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	21,33 \pm 0,02
2	1,79 \pm 0,19
3	4,60 \pm 0,12
4	2,74 \pm 0,05
5	2,03 \pm 0,08
6	1,58 \pm 0,06

9.1.4. Conclusões para manganês em leite materno

Manganês foi determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras, utilizando apenas uma diluição 1:1 com solução de TRIS 80% v/v (pH ajustado para 8), empregando a técnica de GF AAS, com tubo de grafite sem plataforma, sem modificador utilizando calibração aquosa.

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização foram, respectivamente, de 1350°C e 2690°C, enquanto que o melhor tempo de pirólise foi de onze segundos.

Os resultados das precisões intra e inter-ensaio estão dentro do limite máximo aceitável pela AOAC, 1993 (20 ppb – 21% e 1 ppb – 30%). A exatidão do método está adequada tanto pela avaliação por meio do material de referência certificado quanto pelos estudos de recuperação (80-120% de acordo com a EPA, 1992).

9.2. Determinação de Cobre em leite materno por GF AAS

Aleatoriamente uma amostra (amostra referência) de leite materno foi selecionada para otimização e validação do método. Para a otimização esta amostra foi diluída a 10% v/v com solução de TRIS 80% v/v ou MEA 40% v/v e não foi necessário adição de solução padrão de cobre, visto que o próprio leite já continha quantidade suficiente de cobre para uma absorvância próxima de 0,2 unidades. A mistura resultante, tanto para MEA como para TRIS, foi uma suspensão estável até 20 minutos. Assim, após esse tempo as soluções foram homogeneizadas (agitação com micropipeta de volume fixo de 500 µL) novamente. Todas as medidas foram realizadas em área do pico (absorvância integrada).

Para otimização, validação e análise de Cu no leite materno o volume injetado dentro do forno de grafite foi sempre de 10 μ L.

9.2.1. Otimização das condições analíticas

Para o desenvolvimento do método de análise de cobre, dois diluentes foram testados sendo eles TRIS 80% v/v e MEA 20% v/v. Para cada diluente toda a otimização das condições analíticas foi feita e ao final, aquele que apresentou uma melhor exatidão do método, quando testado com material certificado, foi escolhido para a validação e determinação de Cu nas amostras.

Em primeiro lugar, temperaturas e tempos de secagem foram otimizados para cada suspensão obtida da amostra referência com os diferentes diluentes partindo-se das condições recomendadas pelo fabricante, até não se observar borbulhamento da amostra dentro do forno de grafite.

Em seguida, para cada diluente utilizado, foi feita uma seleção do tipo de tubo de grafite a ser usado, com modificadores químicos permanentes (tubos com plataformas de L'vov tratadas com W, Rh, Ru e Ir) e tubo sem modificador (tubo sem plataforma), utilizando o programa de aquecimento do forno recomendado pelo fabricante (Tabela 16). Foram selecionados como os dois melhores tipos de tubo de grafite, aqueles que apresentaram maior sinal analítico, menor sinal de fundo e menor desvio padrão relativo entre as triplicatas de leitura da amostra referência (Tabelas 17 e 18). Os modificadores que apresentaram maior absorvância, sinal de fundo corrigido e menor desvio padrão relativo foram o Rh e a condição sem modificador quando foi utilizado o diluente TRIS e Rh e Ir quando foi utilizado MEA (Tabelas 17 e 18).

Tabela 16 - Programa de aquecimento de forno recomendado pelo fabricante para análise de Cu

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
1	85	5,0	-	3,0
2	95	40,0	-	3,0
3	200	10,0	-	3,0
4	800	5,0	3,0	3,0
5	2300	0,8	2,0	0,0
6	2300	-	2,0	3,0

Tabela 17 - Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Cu em leite materno utilizando TRIS como diluente

TRIS	Absorvância integrada (s)			Fundo	Abs média	%RSD
W	0,0528	0,0754	0,0617	0,0105	0,0633	18
Ir	0,1531	0,1282	0,1597	0,0436	0,1470	11
Rh	0,1475	0,1675	0,1426	0,0439	0,1525	9
Ru	0,1302	0,1278	0,1282	0,0573	0,1287	1
Sem modificador	0,1582	0,1617	0,1612	0,0497	0,1604	1

Tabela 18 - Resultado da seleção de modificadores químicos para otimização das condições analíticas na determinação Cu em leite materno utilizando MEA como diluente

MEA	Absorvância integrada (s)			Fundo	Abs média	%RSD
W	0,1078	0,1108	0,1088	0,0167	0,1091	1
Ir	0,1469	0,1559	0,1579	0,0382	0,1536	4
Rh	0,1603	0,1632	0,1633	0,0566	0,1623	1
Ru	0,1087	0,1194	0,1179	0,0425	0,1153	5
Sem modificador	0,1338	0,1352	0,1272	0,0353	0,1321	3

Assim, dois planejamentos fatoriais fracionados (Tabela 19 e 20) foram empregados para avaliar os efeitos das variáveis estudadas. Os níveis alto e baixo para as variáveis de temperatura e tempo de pirólise foram selecionados de acordo com os valores indicados pelo fabricante (nível baixo) e pela complexidade da matriz (nível alto) para ocorrer uma eficiente correção de fundo. As absorvâncias obtidas nos planejamentos fatoriais para os dois diluentes estão mostradas nas Tabelas 19 e 20.

A avaliação destes planejamentos utilizando MEA e TRIS como diluentes mostrou que todas as variáveis estudadas, bem como todas as possíveis interações entre elas produziram efeito significativo no valor de absorvância, para 95 % de confiança, nos níveis estudados. Os dados podem ser vistos nos gráficos de Pareto mostrados nas Figuras 9 e 10. Os valores positivos para os efeitos indicam que o nível alto produz maiores valores de absorvância que o nível baixo. Os gráficos de Pareto mostram que quando foi utilizado MEA como diluente o melhor modificador foi o Rh (nível alto), enquanto para o TRIS o melhor foi o Ir (nível alto).

Tabela 19 - Matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e absorvâncias obtidas para variáveis para análise de Cu em leite materno utilizando TRIS como diluente

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Modificador	Abs integrada (s)
1	800 (-)	7 (-)	2000 (-)	Sem (-)	0,0850
2	1500 (+)	7 (-)	2000 (-)	Rh (+)	0,1008
3	800 (-)	16 (+)	2000 (-)	Rh (+)	0,0645
4	1500 (+)	7 (+)	2000 (-)	Sem (-)	0,0636
5	800 (-)	7 (-)	2500 (+)	Rh (+)	0,2149
6	1500 (+)	7 (-)	2500 (+)	Sem (-)	0,1576
7	800 (-)	16 (+)	2500 (+)	Sem (-)	0,1750
8	1500 (+)	16 (+)	2500 (+)	Rh (+)	0,1910

Tabela 20 - Matriz de planejamento fatorial e absorvâncias obtidas para otimização das variáveis para análise de Cu em leite materno utilizando MEA como diluente

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Modificador	Abs integrada (s)
1	800 (-)	7 (-)	2000 (-)	Rh (-)	0,0060
2	1500 (+)	7 (-)	2000 (-)	Ir (+)	0,0290
3	800 (-)	16 (+)	2000 (-)	Ir (+)	0,0513
4	1500 (+)	7 (+)	2000 (-)	Rh (-)	0,0839
5	800 (-)	7 (-)	2500 (+)	Ir (+)	0,1903
6	1500 (+)	7 (-)	2500 (+)	Rh (-)	0,1378
7	800 (-)	16 (+)	2500 (+)	Rh (-)	0,0591
8	1500 (+)	16 (+)	2500 (+)	Ir (+)	0,1125

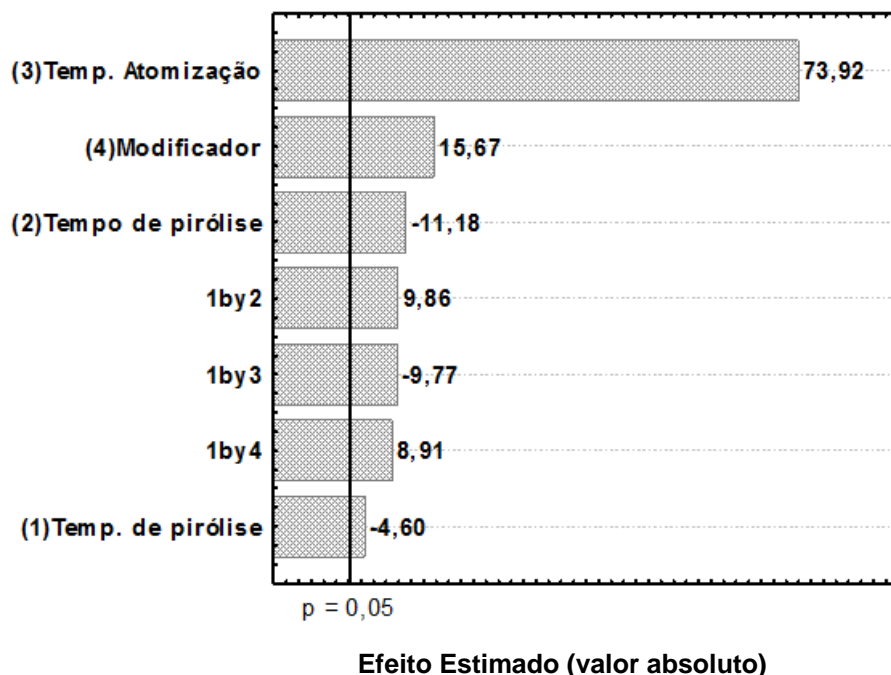


Figura 9 – Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Cu (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9942$).

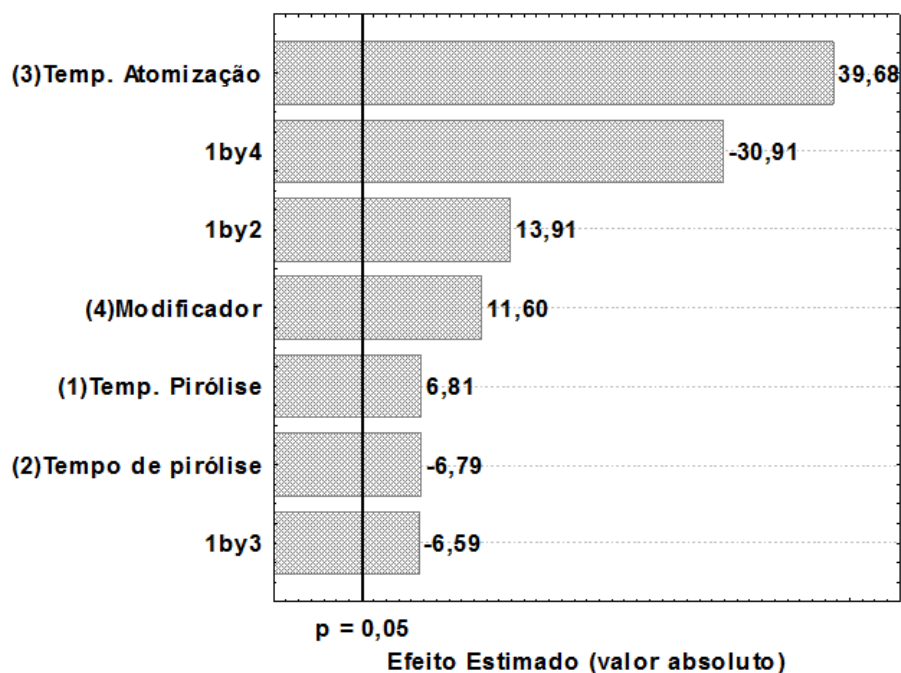


Figura 10 – Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando MEA como diluente na análise de Cu (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9942$).

O planejamento fatorial indica ainda a tendência observada para cada variável. No caso do diluente MEA quando utilizado o nível alto (efeito positivo) para

temperatura de atomização, 2500 °C, o nível alto (efeito positivo) para temperatura de pirólise, 1500°C, e o nível baixo para tempo de pirólise, 7s, os ganhos em sensibilidade foram significativos. Para o diluente TRIS os ganhos em sensibilidade foram significativos quando foi utilizado o nível alto para temperatura de atomização, 2500 °C, o nível baixo para temperatura de pirólise, 800°C e o nível baixo para tempo de pirólise, 7s. Considerando os resultados do planejamento fatorial, foi feito um planejamento composto central (CCD) para cada diluente analisado para determinar as condições ótimas das variáveis numéricas significativas. O ponto central deste planejamento foi escolhido observando-se as tendências indicadas pelo planejamento fatorial. Para MEA o modificador utilizado foi Ir permanente e as variáveis otimizadas foram tempo de pirólise e temperaturas de pirólise e atomização. Para TRIS o modificador foi Rh permanente e as variáveis otimizadas foram as mesmas do MEA. As matrizes destes planejamentos estão resumidas nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cu em leite materno utilizando o diluente MEA

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de Pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Abs Integrada (s)
1	1200	4,0	2300	0,3128
2	1200	4,0	2700	0,3836
3	1200	8,0	2300	0,1524
4	1200	8,0	2700	0,3780
5	1800	4,0	2300	0,2006
6	1800	4,0	2700	0,2590
7	1800	8,0	2300	0,1304
8	1800	8,0	2700	0,1662
9	990	6,0	2500	0,3344
10	2000	6,0	2500	0,0500
11	1500	3,0	2500	0,3258
12	1500	9,0	2500	0,2760
13	1500	6,0	2160	0,2072
14	1500	6,0	2800	0,3842
15 (PC)*	1500	6,0	2500	0,2974**

*PC = ponto central (n = 5), ** Valor médio

Tabela 22 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas do planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cu em leite materno utilizando o diluente TRIS

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de Pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Abs integrada (s)
1	600	4,0	2300	0,1060
2	600	4,0	2700	0,2770
3	600	8,0	2300	0,3774
4	600	8,0	2700	0,4108
5	1000	4,0	2300	0,3450
6	1000	4,0	2700	0,4024
7	1000	8,0	2300	0,1556
8	1000	8,0	2700	0,4088
9	460	6,0	2500	0,3954
10	1140	6,0	2500	0,3622
11	800	3,0	2500	0,4594
12	800	9,0	2500	0,3766
13	800	6,0	2160	0,0558
14	800	6,0	2800	0,4228
15 (PC)*	800	6,0	2500	0,3530**

*PC = ponto central (n = 5), ** Valor médio

A análise do CCD mostrou que, nos níveis estudados, somente o termo quadrático para temperatura de atomização foi significativo quando TRIS foi utilizado como diluente, indicando que valores mais altos desta variável produz melhores resultados. De acordo com o gráfico de Pareto deste planejamento (Figura 12) foram escolhidos os valores otimizados para cada variável, observando os parâmetros lineares e quadráticos. Para as variáveis não significativas (tanto no termo linear quanto no quadrático) foram escolhidos os valores intermediários avaliados, sendo 800°C e 7s para temperatura e tempo de pirólise, respectivamente. Enquanto que para a temperatura de atomização foi seguida a tendência indicada pelo planejamento (nível alto), sendo utilizado o valor de 2700°C.

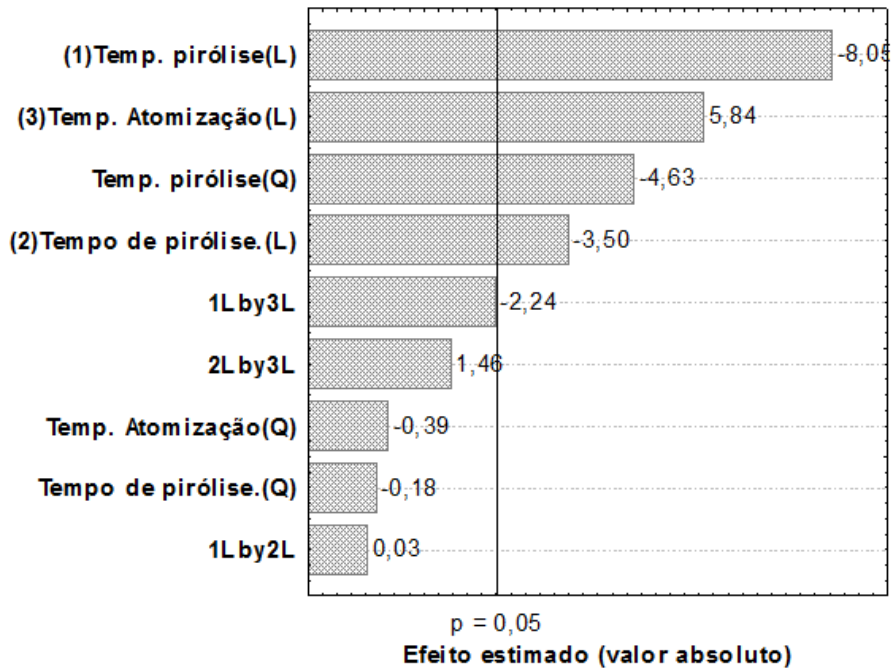


Figura 11 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central utilizando MEA como diluente na análise de Cu (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).

Para o diluente MEA, as três variáveis avaliadas foram significativas. Sendo o nível baixo (1200°C) para temperatura de pirólise, nível baixo (5s) para tempo de pirólise e nível alto (2700°C) para temperatura de atomização como observado no gráfico de Pareto (Figura 11).

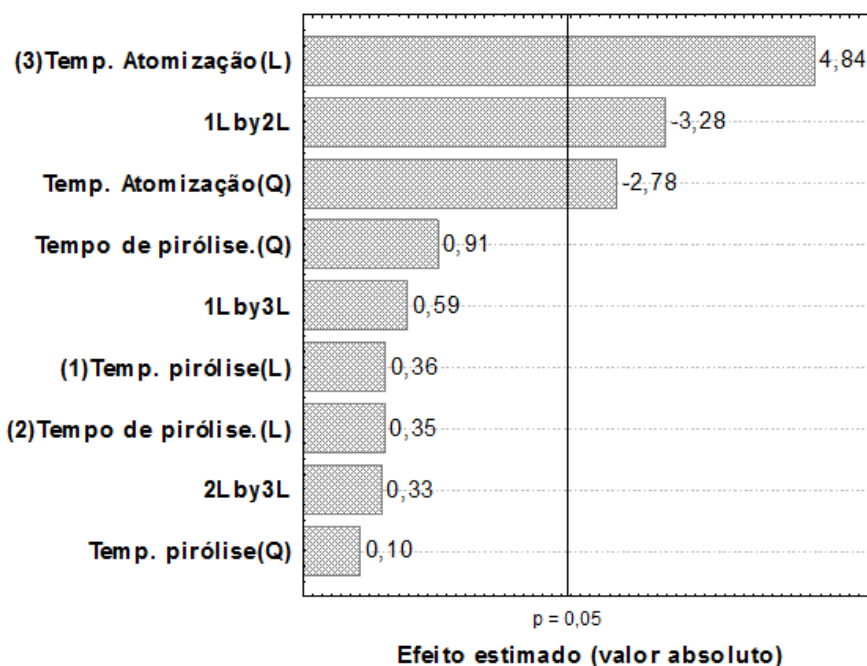


Figura 12 - Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento composto central utilizando TRIS como diluente na análise de Cu (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).

Desta forma os programas de aquecimento de forno otimizados para cada diluente foram idênticos (Tabela 23). Os métodos diferem apenas no tipo de modificador utilizado, Ir para MEA e Rh para TRIS. Nas condições analíticas otimizadas a avaliação do número de queimas que o tubo de grafite suporta não foram feitas porém, pode-se inferir que este número não seja muito grande devido às altas temperaturas.

Tabela 23 - Programa de forno otimizado para análise de Cu em leite materno utilizando TRIS ou MEA como diluentes

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
1	85	5,0	-	3,0
2	95	10,0	-	3,0
3	200	40,0	-	3,0
4	800	5,0	7,0	3,0
5*	2700	0,5	2,0	0,0
6	2700	-	2,0	3,0

*Leitura feita nesta etapa

9.2.2. Validação da metodologia para análise de Cu em leite materno por GF AAS

Usando o programa de aquecimento de forno com as temperaturas e tempos otimizados (Tabela 23), foi construído uma curva de calibração por ajuste de matriz em cada um dos diluentes analisados e foi feita à leitura da solução de material de referência certificado (Infant formula NIST[®] 1846). Os pontos das curvas por ajuste de matriz foram construídos por diluição 1:10 sendo uma parte de leite para dez do diluente, reservando uma parte do diluente para adição do analito. A Tabela 24 nos mostra o resultado da exatidão para os dois diluentes utilizados com resultado satisfatório apenas para o TRIS, num intervalo de confiança de 95%. Assim, para todos os estudos posteriores foi utilizado o TRIS como diluente.

Tabela 24 – Resultados obtidos para Cu após determinação no SRM NIST 1846 por GF AAS em cada diluente

Diluentes	Valores determinados (mg kg ⁻¹)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)
MEA	3,72 ± 0,13	5,24 ± 0,27
TRIS	5,21 ± 0,20	

*Intervalo de confiança de 95%

A Figura 13 nos mostra as curvas de calibração média (n=3) em água e por ajuste de matriz utilizando TRIS como diluente, bem como as equações das retas de regressão linear e os coeficientes de determinação (R²) obtidos. O método apresentou resposta linear às concentrações de cobre compreendidas na faixa de 0 a 180 µg L⁻¹ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. Foi feita a análise estatística comparando as inclinações das curvas obtidas, utilizando teste F e teste t de Student, como descrito no item 6.2, e o resultado nos mostra que há diferença significativa entre

as mesmas para o intervalo de confiança de 95% (Tabela 25). Como a curva de calibração média, por ajuste de matriz foi construída já descontada do branco, pode-se observar uma nítida diferença visual entre ela e a curva aquosa, como mostra a Figura 13. O teste F e teste t de Student também foram aplicados para os interceptos destas curvas. Os resultados nos mostram que há diferença significativa também entre os interceptos, ou seja, tem efeito de matriz. Assim, todos os estudos posteriores foram feitos utilizando-se calibração por ajuste de matriz.

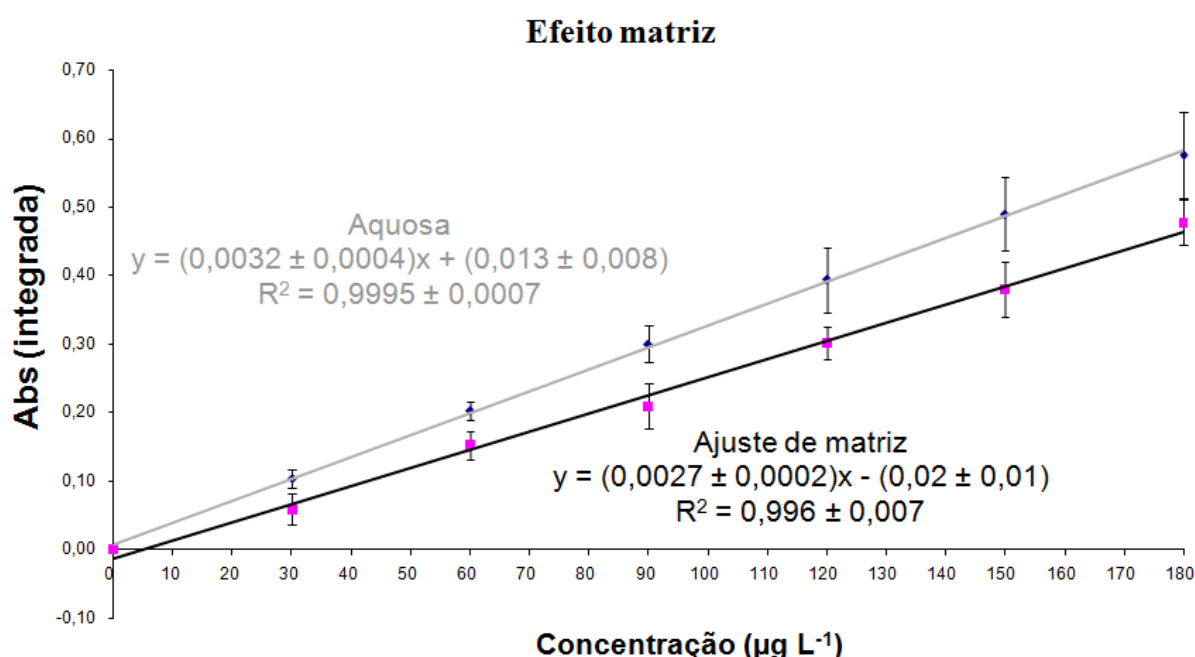


Figura 13 – Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias (n=3) para estudo do efeito de matriz na análise de Cu em leite materno.

Tabela 25 – Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Cu em leite materno

	Calculado		Tabelado	
	Inclinação	Intercepto	Inclinação	Intercepto
F	5,7	2,8	19,0	19,0
t	0,1	4,2	2,8	2,8

Intervalo de confiança de 95%

A validação foi feita de acordo com o item 9. Os limites de detecção e quantificação definidos pelas equações $LOD = 3S/b$ e $LOQ = 10S/b$, foram de $6,4 \mu\text{g L}^{-1}$ e $21,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Limites de detecção semelhantes são encontrados na literatura: $9,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para aguardente de cana (CALDAS, 2007) e $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ em mel (AJTONY, 2007) para determinações de cobre por GF AAS.

A precisão intra-ensaio foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD) de sete replicatas de soluções adicionadas de 30, 90 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$. A média do RSD para a precisão intra-ensaio foi de $(6,4 \pm 0,8) \%$. A precisão inter-ensaio foi avaliada pelo RSD de soluções adicionadas nas mesmas concentrações em três dias consecutivos, apresentando média de $(5 \pm 5) \%$. A massa característica determinada foi de $(19 \pm 2) \text{pg}$ e foi calculada por meio dos dados de uma curva de calibração. A exatidão também foi avaliada por meio de estudos de adição-recuperação em soluções adicionadas de 30, 90 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$. As recuperações mostraram resultados que variaram de 102 a 103 %. Os resultados da precisão e recuperação para cada nível de concentração estão mostrados na Tabela 26 e os demais parâmetros de mérito na Tabela 27.

Tabela 26 - Resultados para precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Cu

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão intra-ensaio (%) (n = 7)	Precisão inter-ensaio (%) (n = 7, por nível por dia)	Recuperação (%) (n = 7)
30	5,6	9,0	102 ± 7
90	6,4	7,3	102 ± 6
150	7,2	0,1	103 ± 8

Tabela 27 - Parâmetros de mérito para análise de cobre em leite materno

Parâmetro	Valor
Equação da Regressão Linear (n = 3)	Abs = (0,0027 ± 0,0002)C _{Cu} - (0,02 ± 0,01)
R ² (n = 3)	0,996 ± 0,007
Faixa linear (µg L ⁻¹)	0 - 180
LOD (µg L ⁻¹)	6,4
LOQ (µg L ⁻¹)	21,4
Massa característica (pg)*	19 ± 2

*Valor recomendado = 6 pg (para medidas em altura)

9.2.3. Determinação de cobre em amostras de leite materno por GF AAS

As amostras foram diluídas 1:10 com solução de TRIS 80% v/v e lidas contra uma curva de calibração por ajuste de matriz.. Na Tabela 28 estão apresentados os níveis de cobre determinados em leite materno de seis amostras colhidas junto à Maternidade Odete Valadares (Belo Horizonte, Brasil). As concentrações de cobre nestas amostras variaram de 384 a 1212 µg L⁻¹.

Tabela 28 - Concentração de cobre em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor ± desvio padrão) (n = 3)

Amostra	Concentração (µg L ⁻¹)
1	1212 ± 17
2	907 ± 27
3	693 ± 9
4	384 ± 6
5	404 ± 17
6	46211

9.2.4. Conclusões da determinação de cobre em leite materno

Cobre foi determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras, utilizando apenas uma diluição 1:10 com solução de TRIS 80% v/v, empregando a técnica de GF AAS, com tubo de grafite e plataforma revestida com 520 µg de ródio e utilizando calibração por ajuste de matriz.

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização foram respectivamente de 800°C e 2700°C, enquanto que o melhor tempo de pirólise foi de sete segundos.

Os resultados das precisões intra e inter-ensaio estão dentro do limite máximo aceitável pela AOAC, 1993 (20 ppb – 21% e 1 ppb – 30%). A exatidão do método está adequada tanto pela avaliação por meio do material de referência certificado quanto pelos estudos de recuperação (80-120% de acordo com a EPA, 1992).

9.3. Determinação de Cromo em leite materno por GF AAS

Aleatoriamente uma amostra (amostra referência) de leite materno foi selecionada para otimização e validação do método. Considerando que o diluente TRIS proporcionou melhores resultados de exatidão tanto na análise de manganês como na de cobre, o diluente MEA foi descartado como opção e somente o TRIS foi utilizado para otimização e validação da metodologia e análise das amostras.

Para a otimização esta amostra foi diluída a 1:1 com solução de TRIS 80% v/v e adicionada de cromo para uma concentração final de 7,5 µg/L (concentração indicada pelo fabricante para gerar um sinal analítico de aproximadamente 0,2 unidades de absorvância medidas em altura). Todas as medidas foram realizadas em área do pico

(absorvância integrada). A mistura resultante foi uma suspensão estável até máximo 20 minutos. Assim, após este tempo as soluções foram homogeneizadas (agitação com micropipeta de volume fixo de 500 μL) novamente.

Para otimização, validação e análise de Cr no leite materno o volume injetado dentro do forno de grafite foi sempre de 20 μL .

9.3.1. Otimização das condições analíticas

Em primeiro lugar, temperaturas e tempos de secagem foram otimizados para a suspensão obtida da amostra referência partindo-se das condições recomendadas pelo fabricante, até não se observar borbulhamento da amostra dentro do forno de grafite.

Tabela 29 - Programa de aquecimento de forno recomendado pelo fabricante para análise de Cr

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
1	85	5,0	-	3,0
2	95	40,0	-	3,0
3	120	10,0	-	3,0
4	1000	5,0	3,0	3,0
5	2600	0,8	2,0	0,0
6	2600	-	2,0	3,0

Em seguida, foi feita uma seleção do tipo de tubo de grafite a ser usado, com modificadores químicos permanentes (tubos com plataformas de L'vov tratadas com W, Rh, Ru e Ir) e tubo sem modificador, utilizando o programa de aquecimento do

forno recomendado pelo fabricante (Tabela 29). Foram selecionados como os dois melhores tipos de tubo de grafite aqueles que apresentaram maior sinal analítico e menor sinal de fundo e menor desvio padrão relativo entre as triplicatas de leitura da amostra referência (Tabela 30). Os modificadores que apresentaram maior absorvância, sinal de fundo corrigido e menor desvio padrão relativo foram W e a condição sem modificador.

Tabela 30 – Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas para determinação de Cr em leite materno utilizando TRIS como diluente

Modificador	Absorvância integrada (s)				Fundo	Abs média	%RSD
W	0,1853	0,1832	0,1756	0,0200	0,1814	3	
Ir	0,1276	0,1261	0,1334	0,0383	0,1290	3	
Rh	0,0767	0,0771	0,0694	0,0179	0,0744	6	
Ru	0,1255	0,1245	0,1180	0,1150	0,1227	3	
Sem modif.	0,4211	0,4316	0,4121	0,0580	0,4211	2	

Assim, um planejamento fatorial fracionado (Tabela 31) foi empregado para avaliar os efeitos das variáveis estudadas. Os níveis alto e baixo para as variáveis de temperatura e tempo de pirólise foram selecionados de acordo com o valor indicado pelo fabricante (nível baixo) e pela complexidade da matriz para ocorrer uma eficiente correção de fundo (nível alto). As absorvâncias obtidas neste planejamento fatorial está mostrada na Tabela 31.

A avaliação deste planejamento mostrou que todas as variáveis estudadas bem como a interação 1:3 produziram efeito significativo no valor de absorvância para 95 % de confiança nos níveis avaliados. Os dados podem ser vistos no gráfico de Pareto na figura 14. Este planejamento indicou que a variável modificador apresentou efeito

negativo com melhores resultados no nível baixo quando não se usou modificador. Os demais efeitos foram positivos com melhores resultados para a temperatura de atomização de 2600 °C, tempo de pirólise de 13 segundos e temperatura de pirólise de 1500 °C.

Tabela 31 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para variáveis para análise de Cr em leite materno utilizando TRIS como diluente

Exp.	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Modificador	Abs integrada (s)
1	1000 (-)	3 (-)	2300 (-)	Sem (-)	0,4351
2	1500 (+)	3 (-)	2300 (-)	W (+)	0,1030
3	1000 (-)	13 (+)	2300 (-)	W (+)	0,1760
4	1500 (+)	13 (+)	2300 (-)	Sem (-)	0,5080
5	1000 (-)	3 (-)	2600 (+)	W (+)	0,1340
6	1500 (+)	3 (-)	2600 (+)	Sem (-)	0,5147
7	1000 (-)	13 (+)	2600 (+)	Sem (-)	0,5452
8	1500 (+)	13 (+)	2600 (+)	W (+)	0,2378

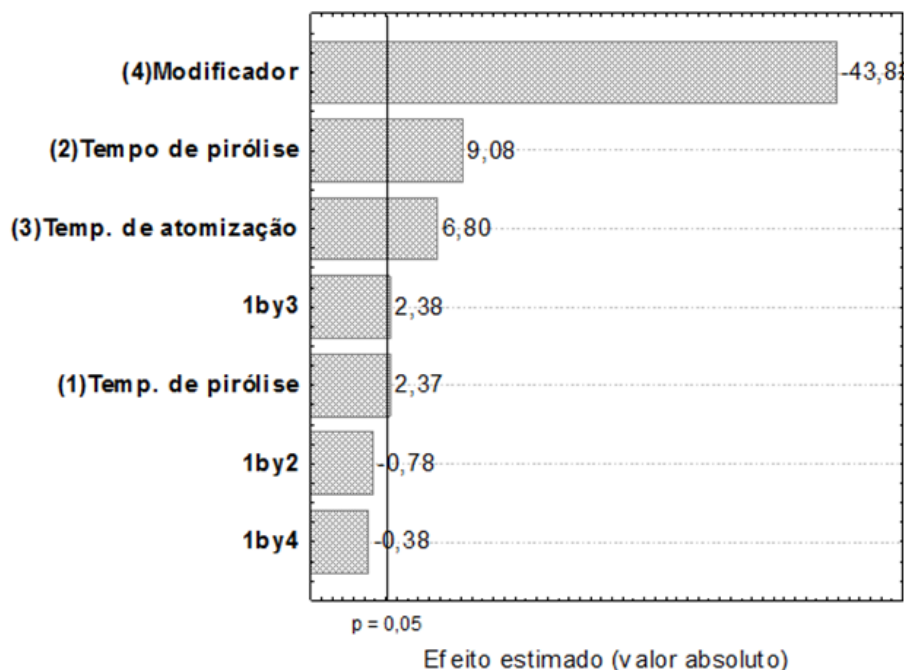


Figura 14 - Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Cr (coeficiente de ajuste do modelo $R = 0,9889$).

Considerando os resultados do planejamento fatorial, foi feito um planejamento composto central (CCD) para determinação das condições ótimas para as variáveis numéricas significativas. O ponto central deste planejamento foi escolhido observando-se as tendências indicadas pelo planejamento fatorial mantendo o tubo sem plataforma e sem uso de modificador. A matriz deste planejamento está resumida na Tabela 32.

Tabela 32 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cr em leite materno utilizando o diluente TRIS

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de Pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Abs Integrada (s)
1	2400	9	1300	0,4497
2	2400	17	1300	0,5214
3	2400	9	1700	0,4254
4	2400	17	1700	0,3978
5	2600	9	1300	0,4346
6	2600	17	1300	0,5579

7	2600	9	1700	0,4694
8	2332	17	1700	0,5332
9	2668	13	1500	0,4295
10	2500	13	1500	0,5381
11	2500	13	1164	0,4053
12	2500	13	1836	0,1132
13	2500	6	1500	0,4574
14	2500	20	1500	0,4453
15 (PC)*	2500	13	1500	0,4341**

*PC = ponto central (n = 5), **Valor médio

A análise do CCD mostrou que, nos níveis estudados, apenas a temperatura de pirólise é significativa (Figura 15) e que a superfície de resposta gerada pelo modelo deste planejamento apresentou um ponto de sela (Figuras 16,17 e 18).

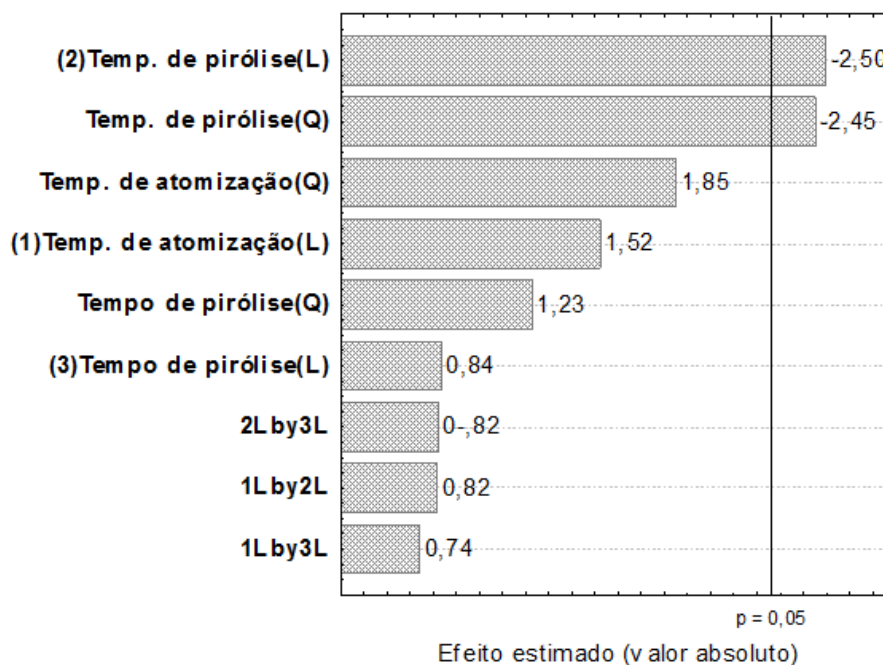


Figura 15 - Gráfico de Pareto gerado por planejamento composto central utilizando TRIS como diluente na análise de Cr (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).

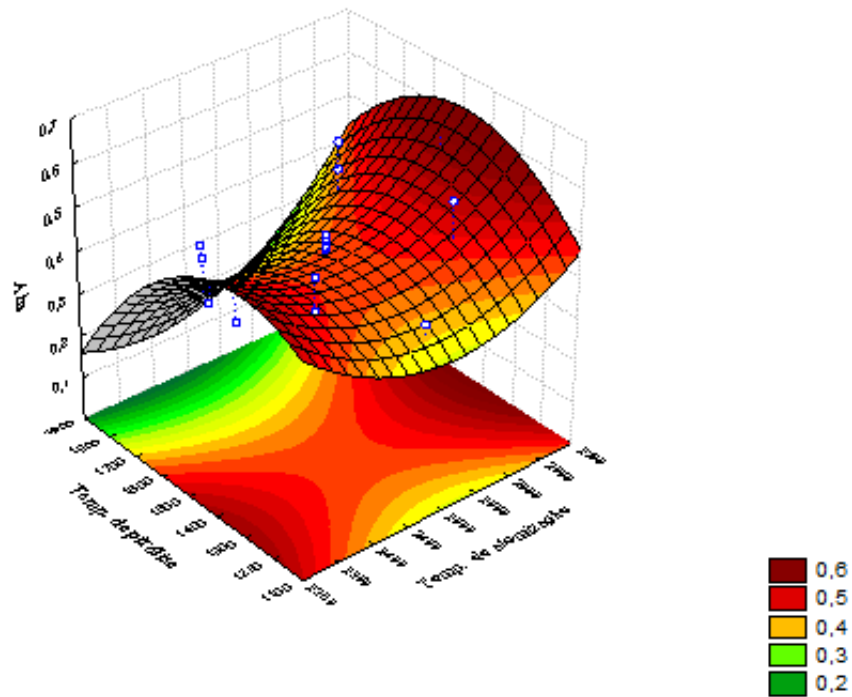


Figura 16 – Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr.

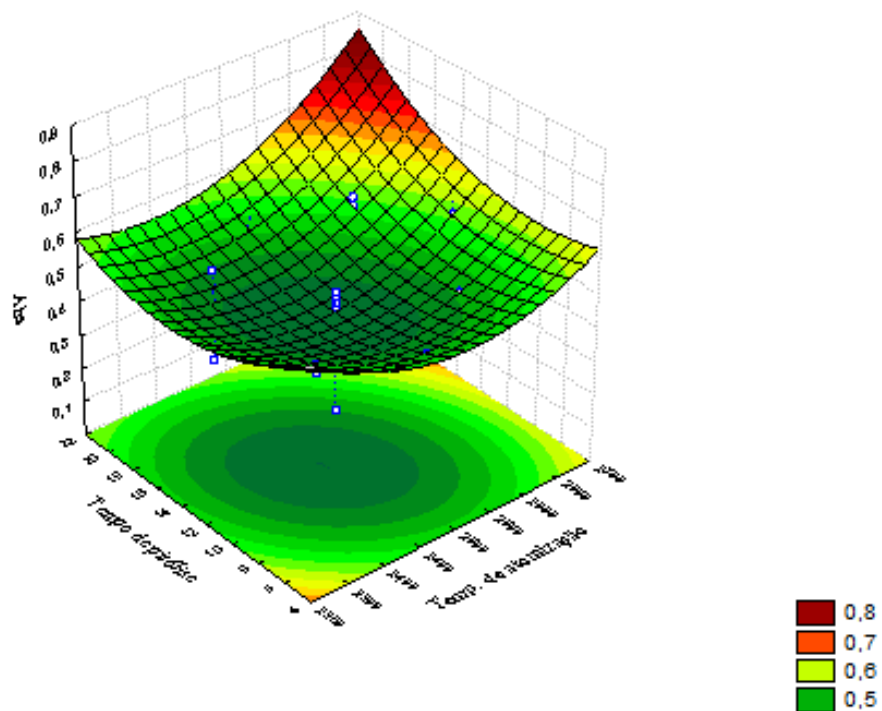


Figura 17 - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis tempo de pirólise e temperatura de atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr.

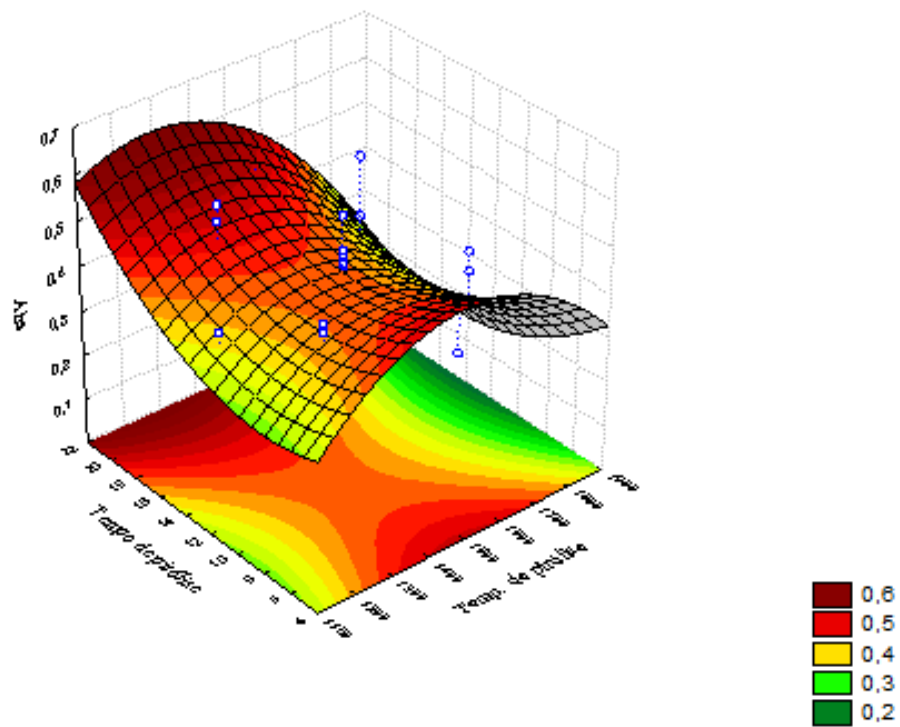


Figura 18 - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperatura e tempo de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr.

Na tentativa de se atingir o ponto de máximo para o sistema em estudo, o planejamento CCD foi deslocado, mantendo fixo o tempo de pirólise em 13s (valor indicado pelo planejamento fatorial). A matriz deste novo planejamento está resumida na tabela 33.

Tabela 33 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por segundo planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Cr em leite materno utilizando o diluente TRIS

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)	Abs Integrada (s)
1	1300	2450	0,3632
2	1300	2650	0,4361
3	1700	2450	0,3553
4	1700	2650	0,4454
5	1220	2550	0,4112
6	1780	2550	0,3251
7	1500	2410	0,4093
8	1500	2690	0,3907
9 (PC)*	1500	2550	0,4655**

*PC = ponto central (n = 5), **Valor médio

A análise deste segundo planejamento composto central revelou que apenas os termos quadráticos para as temperaturas de pirólise e atomização são significativas CCD (Figura 19), e a superfície de resposta gerada (Figura 20) apresentou um ponto de máximo, sendo os valores críticos de 1470°C e 2580°C para temperaturas de pirólise e atomização, respectivamente.

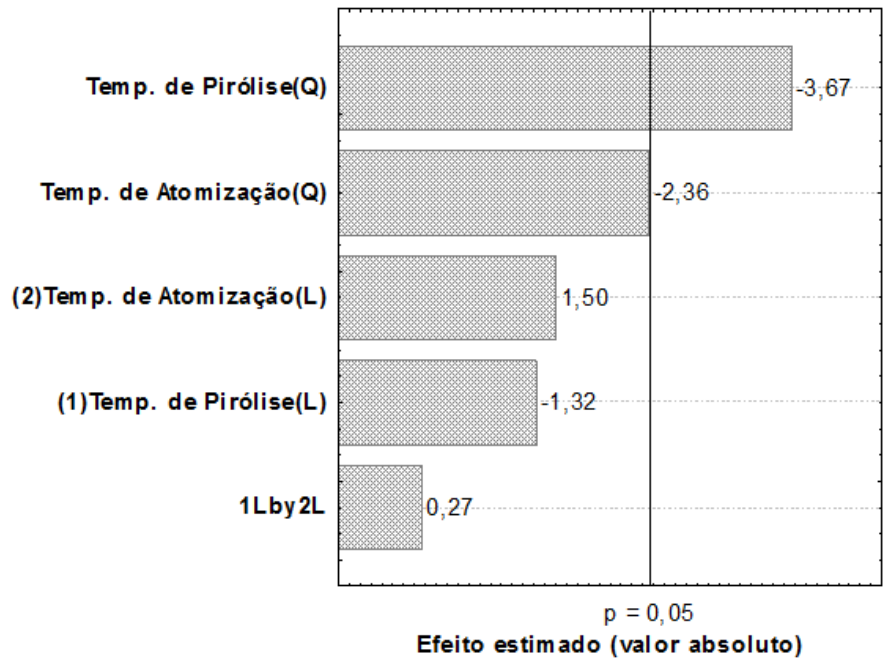


Figura 19 - Gráfico de Pareto gerado por segundo planejamento composto central) utilizando TRIS como diluente (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado) na análise de Cr.

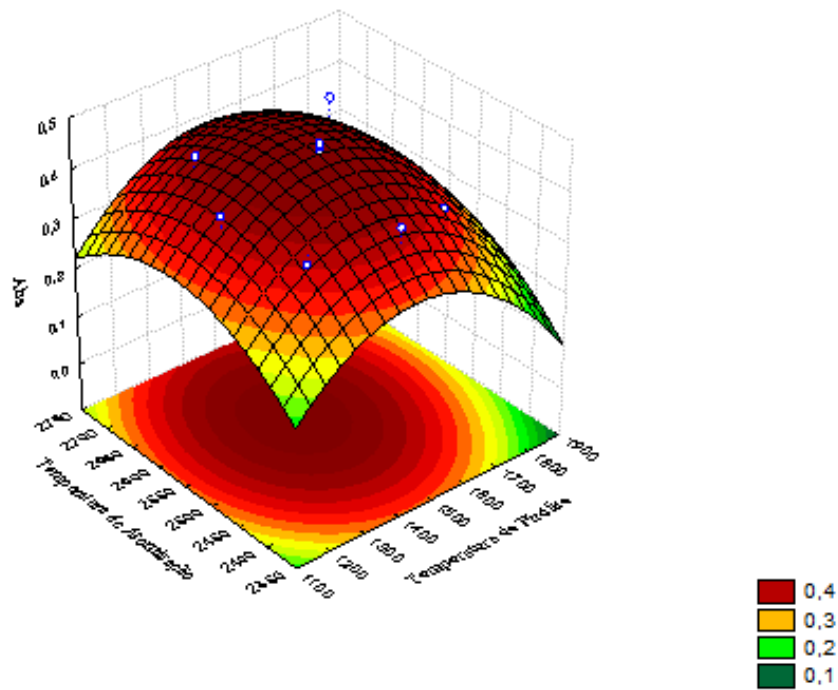


Figura 20 – Superfície de resposta gerada por segundo planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Cr.

A Tabela 34 nos mostra os programas de forno otimizado. Nas condições analíticas otimizadas a avaliação do número de queimas que o tubo de grafite suporta não foram feitas porém, pode-se inferir que este número não seja muito grande devido à alta temperatura de atomização utilizada, que leva a um desgaste maior do tubo.

Tabela 34 - Programa de aquecimento de forno otimizado para análise de Cr em leite materno utilizando TRIS como diluente

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
1	85	5,0	-	3,0
2	95	40,0	-	3,0
3	200	10,0	-	3,0
4	1470	20,0	13,0	3,0
5*	2580	0,5	5,0	0,0
6	2600	-	3,0	3,0

*Leitura nesta etapa

9.3.2. Validação da metodologia para análise de Cr em leite materno por GF AAS

A validação foi feita de acordo com o item 9 e usando o programa de forno com as temperaturas e tempos otimizados mostrados na tabela 34.

A Figura 21 nos mostra as curvas de calibração média (n=3) em água e por ajuste de matriz utilizando TRIS como diluente, bem como as equações das retas de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos. Os pontos das curvas por ajuste de matriz foram construídos por diluição 1:1 sendo cinco partes de leite para cinco do diluente, reservando uma parte do diluente para adição do analito. O método

apresentou resposta linear às concentrações de cromo compreendidas na faixa de 0 a 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. Foi feita a análise estatística comparando as inclinações das curvas obtidas, utilizando teste F e teste t de Student, como descrito no ítem 6.2, e o resultado mostra que não há diferença significativa entre as mesmas para o intervalo de confiança de 95% (Tabela 35). Assim, todos os estudos posteriores foram feitos utilizando-se calibração aquosa.

Tabela 35 – Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Cr em leite materno

	Calculado	Tabelado
F	1,5	19,0
t	0,8	2,8

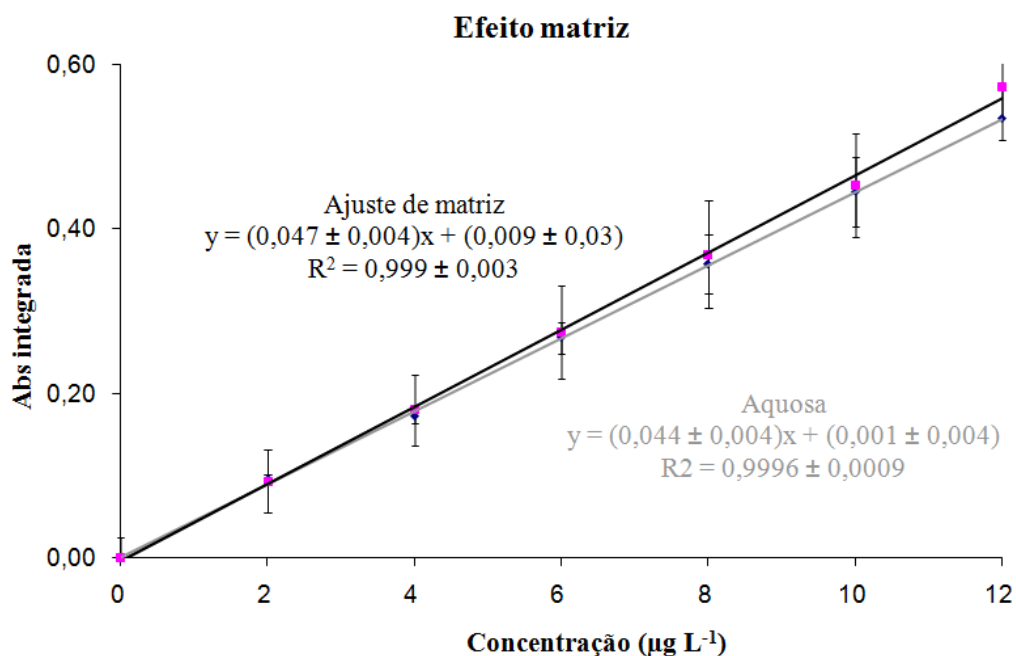


Figura 21 – Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias (n=3) para estudo do efeito de matriz na análise de Cr em leite materno.

A validação foi feita de acordo com o item 9. Os limites de detecção e quantificação definidos pelas equações $LOD = 3S/b$ e $LQ = 10S/b$, onde S é o desvio padrão de dez leituras independentes de solução da amostra referência adicionada do menor ponto da curva de calibração e b a inclinação da curva de calibração, foram de $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,55 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O limite de detecção $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ pode ser considerado bom em comparação com alguns limites de detecção encontrados na literatura: $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ em água (MINAMI, 2005) e $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ em mel (AJTONY, 2007) para determinações de cromo por GF AAS.

A precisão intra-ensaio foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD) de sete replicatas de soluções adicionadas de 2, 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$. A média do RSD para a precisão intra-ensaio foi de $(1,9 \pm 0,7) \%$. A precisão inter-ensaio foi avaliada pelo RSD de soluções adicionadas nas mesmas concentrações em três dias consecutivos, apresentando média de $(5,4 \pm 4) \%$. A massa característica determinada foi de $(1,96 \pm 0,07) \text{pg}$ e foi calculada através dos dados da média de três curvas de calibração aquosas. A exatidão foi avaliada por estudos de adição-recuperação em soluções adicionadas de 2, 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e por material de referência certificado (Urine, Bio - Rad Laboratories, Lyphochek® - Metals Urine Control - 69081, Irvine, CA, USA). As recuperações mostraram resultados que variaram de 95 a 100 %. Os resultados para precisão e recuperação para cada nível de são mostrados na tabela 36 e os demais parâmetros de mérito estão resumidos na tabela 37.

Tabela 36 - Resultados para precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Cr

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão Intra-ensaio (%, n=7)	Precisão Inter-ensaio (%, n=21)	Recuperação (%, n = 7)
2	2,6	5,8	100 \pm 3
5	1,3	4,4	95 \pm 1
10	1,6	3,2	100 \pm 2
Material certificado	Certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$) 0,9 a 1,3	Determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$, n = 3) 0,95 \pm 0.03 ^a	

^a intervalo de confiança a 95%

Tabela 37 - Parâmetros de mérito para análise de cromo em leite materno

Parâmetro	Valor
Equação da Regressão (n = 3)	Abs = (0,044 \pm 0,004) C_{Cr} + (0,001 \pm 0,004)
R ² (n = 3)	0,9996 \pm 0,0009
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0 - 12
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,17
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,55
Massa característica (pg)*	1,96 \pm 0,07

*Valor recomendado = 1,5 pg

9.3.3. Determinação de cromo em amostras de leite materno por GF AAS

As amostras foram diluídas 1:1 com solução de 80% v/v de TRIS e lidas contra uma curva de calibração aquosa. Na Tabela 38 estão apresentados os níveis de cromo determinados em leite materno de seis amostras colhidas junto à Maternidade Odete

Valadares (Belo Horizonte, Brasil). As concentrações de cromo nestas amostras variaram de 0,69 a 17,33 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 38. Concentração de cromo em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor \pm desvio padrão) (n = 3)

Amostra	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	0,69 \pm 0,01
2	3,69 \pm 0,14
3	9,47 \pm 0,20
4	17,33 \pm 0,59
5	7,49 \pm 0,43
6	2,32 \pm 0,11

9.3.4. Conclusões para determinação de cromo em leite materno

Cromo foi determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras, utilizando apenas uma diluição 1:1 com solução 80% v/v de TRIS empregando a técnica de GF AAS, com tubo de grafite sem plataforma, sem uso de modificador permanente ou químico e utilizando calibração aquosa.

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização são respectivamente de 1470°C e 2580°C, enquanto que o melhor tempo de pirólise foi de 13s.

As precisões intra e inter-ensaio estão dentro do limite máximo aceitável pela AOAC, 1993 (20 ppb – 21% e 1 ppb – 30%). A exatidão do método está adequada tanto quando avaliada através do material de referência certificado quanto pelos estudos de recuperação (80-120% de acordo com a EPA, 1992).

9.4. Determinação de Chumbo em leite materno por GF AAS

Aleatoriamente uma amostra (amostra referência) de leite materno foi selecionada para otimização e validação do método.

Para a otimização esta amostra foi diluída a 1:1 com solução de TRIS 80% v/v e adicionada de chumbo para uma concentração final de 27 µg/L (concentração indicada pelo fabricante para gerar um sinal analítico de 0,2 unidades de absorvância medidas em altura e quando injetado 20 µL de solução). A mistura resultante é uma suspensão estável por até máximo 20 minutos. Assim, após este tempo as suspensões foram homogeneizadas (agitação com micropipeta de volume fixo de 500 µL) novamente. Todas as medidas foram realizadas em altura de pico.

Para otimização, validação e análise de Pb no leite materno o volume injetado dentro do forno de grafite foi sempre de 10 µL de solução da amostra.

9.4.1. Otimização das condições analíticas

Em primeiro lugar, temperaturas e tempos de secagem foram otimizados para a suspensão da amostra referência partindo-se das condições recomendadas pelo fabricante, até não se observar borbulhamento da amostra dentro do forno de grafite.

Em seguida uma seleção do tipo de tubo de grafite a ser utilizado, com modificadores químicos permanentes (tubos com plataforma de L'vov tratadas com W, Rh, Ru e Ir, Nb, Ta ou Ti), e todos os anteriores com co-injeção de 5 µL de solução de ródio 1,0 g/L ou 5 µL de solução de Nb 1,0 g/L. Esta co-injeção foi uma estratégia

adotada na tentativa de minimizar o sinal de fundo sem grandes perdas em sensibilidade. A temperatura de atomização recomendada é muito baixa (400°C) e não é suficiente para destruição da matriz. Sendo assim, a triagem foi feita utilizando o programa de aquecimento do forno recomendado pelo fabricante, mudando a temperatura de pirólise para 700°C (Tabela 39).

Tabela 39 - Programa de aquecimento de forno recomendado pelo fabricante para análise de Pb

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
1	85	5,0	-	3,0
2	95	40,0	-	3,0
3	120	10,0	-	3,0
4	400	5,0	3,0	3,0
5*	2100	0,9	2,0	0,0
6	2100	-	2,0	3,0

O modificador procurado ou a combinação deles deve diminuir o sinal de fundo e reter o analito até a etapa de atomização. Os resultados da triagem de modificadores estão mostrados nas tabelas 40, 41 e 42. Foram selecionados como melhores aqueles que apresentaram maior sinal analítico, menor sinal de fundo e menor desvio padrão relativo entre triplicatas de leitura. As combinações de modificadores que apresentaram maior absorvância, sinal de fundo corrigido e menor desvio padrão relativo foram W e Ru, ambos com co-injeção de Rh.

Tabela 40 – Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente

Modificador	Absorvância (altura)			Fundo	Abs média	%RSD
Nb	0,0970	0,0965	0,0818	1,5195	0,0918	9
Ta	0,0839	0,1000	0,0960	0,7734	0,0933	9
Ti	0,0931	0,1045	0,0882	1,3286	0,0953	9
Ir	0,0601	0,0695	0,0449	1,2003	0,0572	30
W	0,0897	0,0815	0,0837	1,0663	0,0850	5
Rh	0,0633	0,0541	0,0569	1,0215	0,0581	8
Ru	0,0817	0,0782	0,0768	1,4104	0,0789	3

Tabela 41 – Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente com co-injeção de 5µL de Nb

Modificador	Absorvância (altura)*			Fundo	Abs média	%RSD
Nb	0,0957	0,0762	0,0681	1,1026	0,0800	18
Ta	0,0896	0,0684	0,0698	1,0010	0,0759	16
Ti	0,0902	0,0680	0,0923	1,1952	0,0634	66
Ir	0,0665	0,0465	0,0571	0,7098	0,0518	14
W	0,0803	0,0615	0,0641	0,8096	0,0686	15
Rh	0,0990	0,0806	0,0883	1,1195	0,0893	10
Ru	0,1174	0,1039	0,1035	1,3520	0,1083	7

*Os valores já estão descontados do branco (5 µL de Nb)

Tabela 42 – Resultado da seleção de modificadores para otimização das condições analíticas na determinação de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente com co-injeção de 5µL de Rh

Modificador	Absorvância			Fundo	Abs média	%RSD
	(altura)*					
Nb	0,1028	0,0962	0,0913	0,3535	0,0968	6
Ta	0,1019	0,0913	0,0935	0,4348	0,0956	6
Ti	0,0968	0,0995	0,1069	0,4946	0,1011	5
Ir	0,0396	0,0436	0,0413	0,3959	0,0425	4
W	0,0972	0,1032	0,1039	0,0562	0,1014	4
Rh	0,0778	0,0693	0,0700	0,3985	0,0724	7
Ru	0,1173	0,1148	0,1074	0,2609	0,1132	5

*Os valores já estão descontados do branco (5 µL de Rh)

Assim, um planejamento fatorial fracionado (Tabela 43) foi empregado para avaliação preliminar dos efeitos das variáveis estudadas. Os níveis alto e baixo para as variáveis de temperatura e tempo de pirólise foram selecionados de acordo com o valor indicado pelo fabricante (nível baixo) e pela complexidade da matriz (nível alto) para ocorrer uma eficiente correção de fundo.

A avaliação deste planejamento mostrou que todas as variáveis estudadas, bem como as interações entre temperatura de pirólise com tempo de pirólise e temperatura de pirólise com temperatura de atomização produzem efeito significativo no valor de absorvância a 95% de confiança, como pode ser visto no gráfico de Pareto na figura 22. O planejamento indicou que as variáveis temperaturas de atomização e de pirólise, tempo de pirólise e modificador têm efeito positivo, com melhores resultados no nível alto, ou seja, 2500°C, 900°C, 12s e Ru com co-injeção de ródio, respectivamente.

Tabela 43 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para variáveis na análise de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente

Exp.	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de Pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Modificador	Abs
1	500 (-)	3 (-)	2000 (-)	W + co-Rh (-)	0,0406
2	900 (+)	3 (-)	2000 (-)	Ru + co-Rh (+)	0,1120
3	500 (-)	12 (+)	2000 (-)	Ru + co-Rh (+)	0,0929
4	900 (+)	12 (+)	2000 (-)	W + co-Rh (-)	0,1056
5	500 (-)	3 (-)	2500 (+)	Ru + co-Rh (+)	0,1811
6	900 (+)	3 (-)	2500 (+)	W + co-Rh (-)	0,1090
7	500 (-)	12 (+)	2500 (+)	W + co-Rh (-)	0,1624
8	900 (+)	12 (+)	2500 (+)	Ru + co-Rh (+)	0,1762

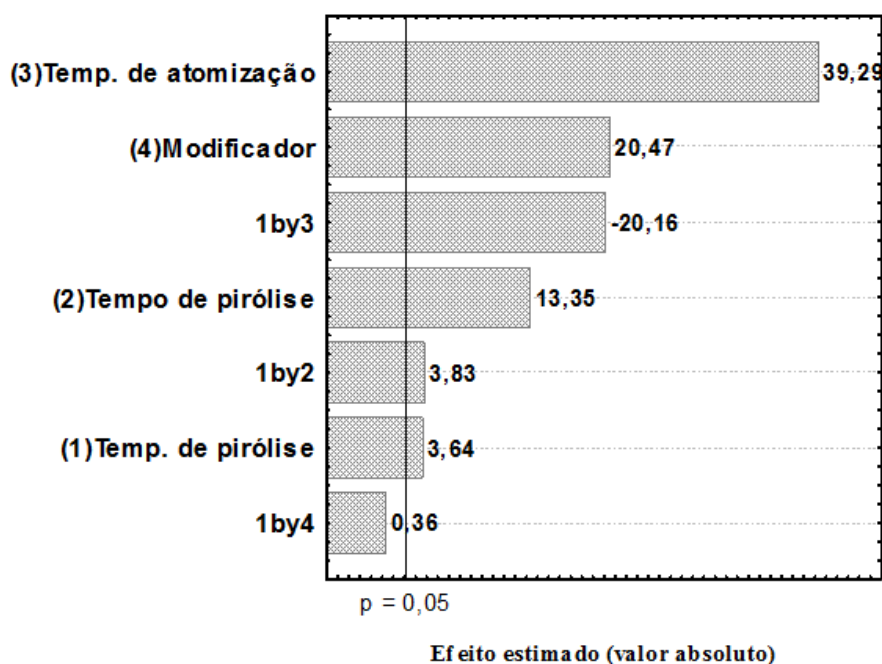


Figura 22 - Gráfico de Pareto gerado por planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) utilizando TRIS como diluente na análise de Pb (coeficiente de ajuste do modelo R = 0,9911).

Considerando os resultados do planejamento fatorial, foi feito um planejamento composto central (CCD) para determinação das condições ótimas para as variáveis numéricas significativas. O ponto central deste planejamento foi escolhido observando-

se as tendências indicadas pelo planejamento fatorial usando o tubo de grafite sem plataforma e sem uso de modificador. A matriz deste planejamento está resumida na Tabela 44.

Tabela 44 - Matriz de experimentos e absorvâncias obtidas por planejamento composto central para otimização das variáveis significativas na análise de Pb em leite materno utilizando o diluente TRIS

Exp.	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de pirólise (s)	Temperatura de atomização (°C)	Abs
1	700	8	2300	0,1479
2	700	8	2700	0,1421
3	700	16	2300	0,1505
4	700	16	2700	0,1413
5	1100	8	2300	0,1534
6	1100	8	2700	0,1435
7	1100	16	2300	0,1514
8	1100	16	2700	0,1546
9	560	12	2500	0,1215
10	1240	12	2500	0,1395
11	900	5	2500	0,1525
12	900	19	2500	0,1615
13	900	12	2164	0,0824
14	900	12	2800	0,1294
15 (PC)*	900	12	2500	0,1713**

*PC = ponto central (n = 5), **Valor médio

A avaliação do CCD mostrou que apenas os termos quadráticos para as temperaturas de pirólise e atomização são significativos nos níveis avaliados (Figura 23) e que a superfície de resposta gerada pelo modelo deste planejamento apresenta um

ponto de máximo (Figuras 24,25 e 26) em 950°C, 17s e 2530°C para temperatura e tempo de pirólise e temperatura de atomização, respectivamente.

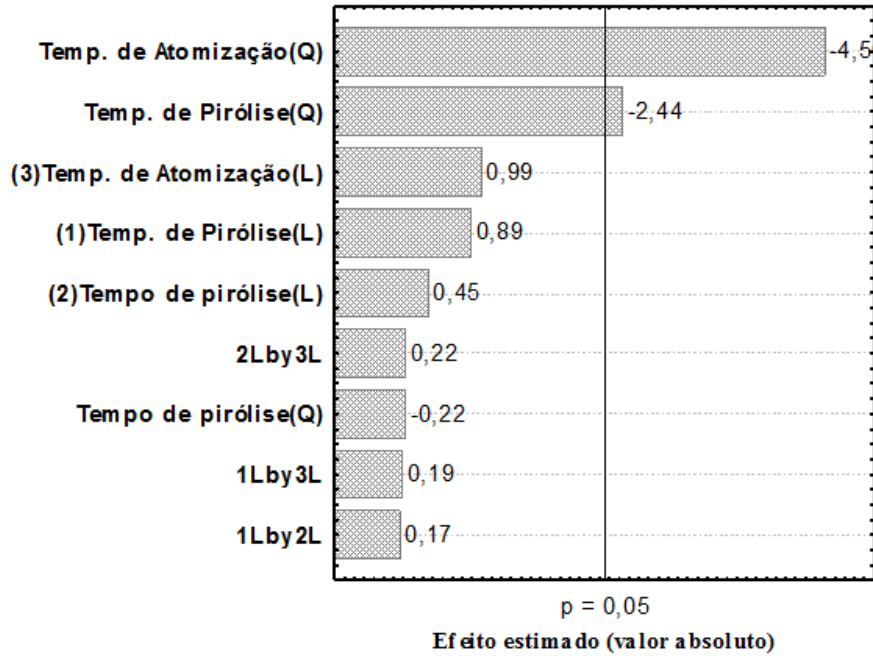


Figura 23 - Gráfico de Pareto gerado por planejamento composto central utilizando TRIS como diluente na análise de Pb (L e Q referem-se aos termos lineares e quadráticos do modelo gerado).

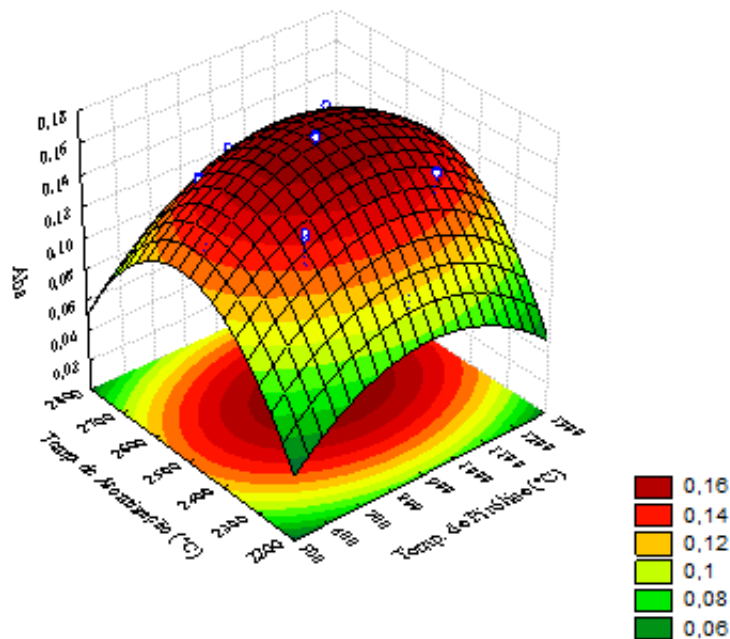


Figura 24 – Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Pb.

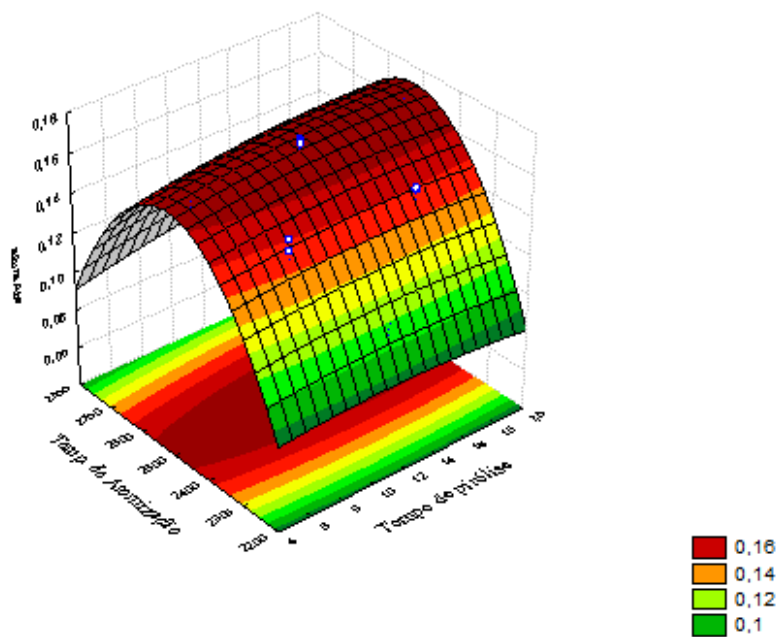


Figura 25 - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperatura atomização e tempo de pirólise utilizando TRIS como diluente na análise de Pb.

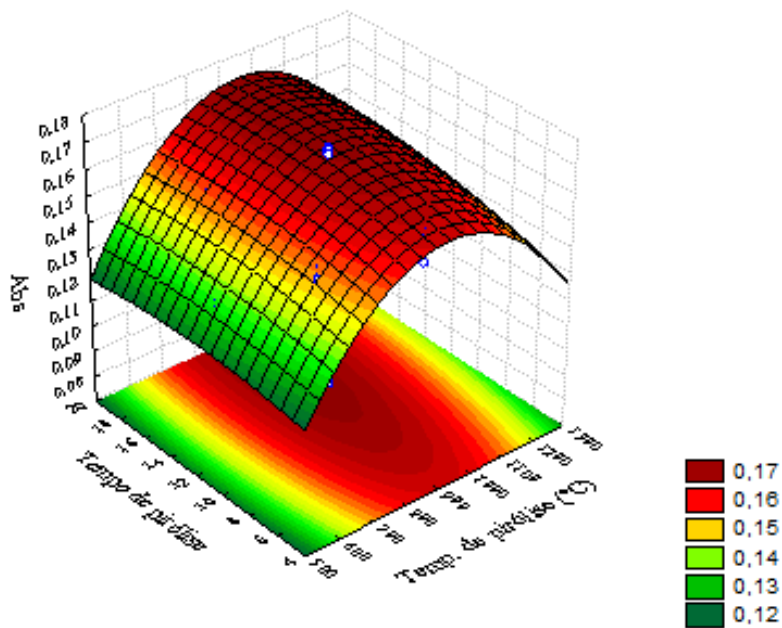


Figura 26 - Superfície de resposta gerada por planejamento composto central para otimização das variáveis temperaturas e tempo de pirólise e atomização utilizando TRIS como diluente na análise de Pb.

A Tabela 45 mostra os programas de aquecimento de forno otimizado. Nas condições analíticas otimizadas a avaliação do número de queimas que o tubo de grafite suporta não fora feita.

Tabela 45 - Programa de aquecimento de forno otimizado para análise de Pb em leite materno utilizando TRIS como diluente

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (L min⁻¹)
1	85	5,0	-	3,0
2	95	40,0	-	3,0
3	200	10,0	-	3,0
4	950	5,0	17,0	3,0
5*	2530	0,7	3,0	0,0
6	2530	-	2,0	3,0

*Leitura nesta etapa

9.4.2. Validação da metodologia para análise de Pb em leite materno por GF AAS

A validação foi feita de acordo com o item 9 e usando o programa de forno com as temperaturas e tempos otimizados mostrados na tabela 45.

A Figura 27 nos mostra as curvas de calibração média (n=3) em água e por ajuste de matriz utilizando TRIS como diluente, bem como as equações das retas de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos. Os pontos das curvas por ajuste de matriz foram construídos por diluição 1:1 sendo cinco partes de leite para cinco do diluente, reservando uma parte do diluente para adição do analito. O método apresentou resposta linear às concentrações de chumbo compreendidas na faixa de 0 a

48 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. Foi feita a análise estatística comparando as inclinações das curvas obtidas, utilizando teste F e teste t de Student, como descrito no item 6.2, e o resultado nos mostra que não há diferença significativa entre as mesmas para o intervalo de confiança de 95% (Tabela 46). Assim, todos os estudos posteriores foram feitos utilizando-se calibração aquosa.

Tabela 46 – Parâmetros estatísticos para avaliação do efeito de matriz na análise de Pb em leite materno

	Calculado	Tabelado
F	5,3	19,0
t	0,7	2,8

Intervalo de confiança de 95%

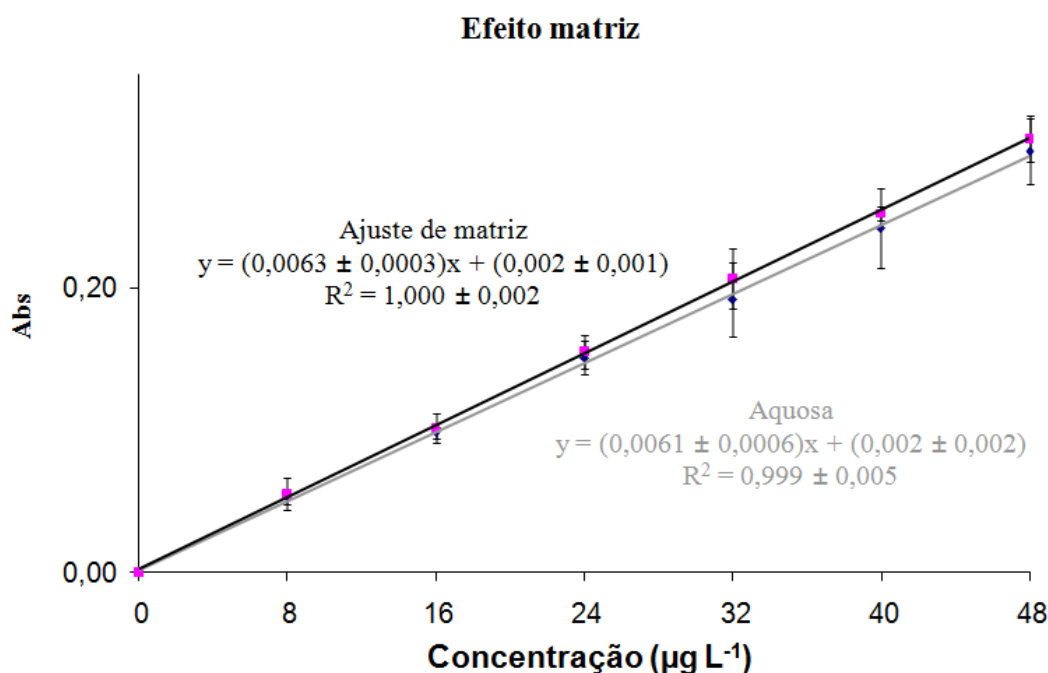


Figura 27 – Curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz médias ($n=3$) para estudo do efeito de matriz na análise de Pb em leite materno.

Os limites de detecção e quantificação definidos pelas equações $\text{LOD} = 3S/b$ e $\text{LQ} = 10S/b$, onde S é o desvio padrão de dez leituras independentes de solução da

amostra referência adicionada do menor ponto da curva de calibração e b a inclinação da curva de calibração, foram de $0,92 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,07 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O limite de detecção encontrado, $0,92 \mu\text{g L}^{-1}$, pode ser considerado bom em comparação com alguns limites de detecção encontrados na literatura: $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para vinagre (OLIVEIRA, 2007), e $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$ em água (CHEN, 2005) e $1,5 \text{mg L}^{-1}$ em urina (HUSÁKOVÁ, 2007) para determinações de chumbo por GF AAS.

A precisão intra-ensaio foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD) de sete replicatas de soluções adicionadas de 8, 24 e $40 \mu\text{g L}^{-1}$. A média do RSD para a precisão intra-ensaio foi de $(5 \pm 1) \%$. A precisão inter-ensaio foi avaliada pelo RSD de soluções adicionadas nas mesmas concentrações em três dias consecutivos, apresentando média de $(6,3 \pm 0,3) \%$. A massa característica determinada foi de $(7,1 \pm 0,3) \text{pg}$ e foi calculada através dos dados da média de três curvas de calibração aquosas. A exatidão foi avaliada através de estudos de adição-recuperação em soluções adicionadas de 8, 24 e $40 \mu\text{g L}^{-1}$ e através de sangue certificado (Bio - Rad Laboratories, Lyphochek® - Metals Blood Control, Irvine, CA, USA). As recuperações mostraram resultados que variaram de 107 a 109 %. Os resultados para precisão e recuperação para cada nível de são mostrados na tabela 47 e os demais parâmetros de mérito estão resumidos na tabela 48.

Tabela 47 - Resultados para precisão intra e inter ensaio e recuperação para cada nível de concentração estudado na análise de Pb

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão Intra-ensaio (%, n=7)	Precisão Inter-ensaio (%, n=21)	Recuperação (%, n = 7)
8	5,0	6,7	109 \pm 6
24	3,3	6,1	107 \pm 4
40	6,1	6,2	109 \pm 7
Material certificado	Certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$) 202 a 273	Determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$, n = 3) 267 \pm 4 ^a	

^a intervalo de confiança a 95%

Tabela 48 - Parâmetros de mérito para análise de chumbo em leite materno

Parâmetro	Valor
Equação da Regressão (n = 3)	Abs = (0,0061 \pm 0,0006) C_{Pb} + (0,002 \pm 0,002)
R ² (n = 3)	0,999 \pm 0,005
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0 – 48
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,92
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,07
Massa característica (pg)*	7,1 \pm 0,3

*Valor recomendado = 5,5 pg

9.4.3. Determinação de chumbo em amostras de leite materno por GF AAS

As amostras foram diluídas 1:1 com solução de 80% v/v de TRIS (pH ajustado para 8), e lidas contra uma curva de calibração aquosa. Na Tabela 49 estão apresentados os níveis de chumbo determinados em leite materno de seis amostras colhidas junto à Maternidade Odete Valadares (Belo Horizonte, Brasil). As concentrações de chumbo nestas amostras variaram de não detectado a 22,32 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 49. Concentração de chumbo em seis amostras de leite materno analisadas pelo método proposto (valor \pm desvio padrão) (n = 3)

Amostra	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	ND*
2	< LQ**
3	27,90 \pm 3,10
4	12,66 \pm 0,02
5	22,32 \pm 1,08
6	< LQ

*ND = não detectado, **LQ = limite de quantificação

9.4.4. Conclusões para determinação de chumbo em leite materno

Chumbo foi determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras, utilizando apenas uma diluição 1:1 com solução de TRIS 80% v/v (pH ajustado para 8), empregando a técnica de GF AAS, com tubo de grafite e plataforma revestida com 520 μg de rutênio, co-injeção de 5 μL de solução de ródio 1,0 g L^{-1} e utilizando calibração aquosa. O uso de co-injeção de modificador químico foi eficiente para remoção da matriz sem levar a grandes perdas na sensibilidade.

As temperaturas ótimas de pirólise e atomização e foram respectivamente de 950°C e 2530°C, enquanto que o melhor tempo de pirólise foi de 17s.

As precisões intra e inter-ensaio estão dentro do limite máximo aceitável pela AOAC, 1993 (20 ppb – 21% e 1 ppb – 30%). A exatidão do método está adequada tanto quando avaliada através do material de referência certificado quanto pelos estudos de recuperação (80-120% de acordo com a EPA, 1992).

10. Conclusões finais

Com base nos estudos desenvolvidos nesta dissertação, pode-se concluir que foi possível a determinação direta (sem necessidade de digestão prévia das amostras), com adequadas sensibilidade, exatidão e precisão de manganês, cobre, cromo e chumbo em amostras de leite humano por GF AAS.

As amostras de leite foram diluídas com solução de TRIS (hidroximetilaminometano 80% v/v + ácido cítrico até pH = 8) na proporção de 1:1 para análises de Mn, Cr e Pb e, 1:10 na análise de Cu.

A otimização das condições de análise utilizando a quimiometria foi um procedimento simples e rápido para se obter métodos com sensibilidade, precisão e exatidão desejados, fazendo o uso de um número reduzido de experimentos em relação à otimização univariada economizando, assim, tempo, reagentes, amostras, tubos de grafite, etc.

A sensibilidade, de uma forma geral foi boa para todos os métodos propostos para cada conjunto metal/matriz o que pode ser observado pelas massas características e limites de detecção obtidos. A calibração, em todos os casos seja empregando a técnica de ajuste de matriz ou calibração aquosa, apresentou coeficientes de correlação linear aceitáveis.

Os limites de detecção encontrados para cada método foram semelhantes aos encontrados na literatura para amostras diversas. As amostras apresentaram concentrações compreendidas na faixa de 1,6 – 21,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Mn; 384 – 1212 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu; 0,7 – 17,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cr e de não detectado a 22,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Pb.

O uso de co-injeção de modificador químico mostrou ser uma boa alternativa quando apenas o modificador permanente não é suficiente para resultados com boa sensibilidade e sinal de fundo corrigido.

Estudos de exatidão e de precisão efetuados através materiais de referência certificados e de recuperações (valores entre 89% e 109%) dos metais em amostras artificialmente contaminadas, mostraram resultados aceitáveis com desvios padrões relativos compatíveis com a técnica de GF AAS para todos os metais.

11. Referências Bibliográficas

- AJTONY, Z., BENCS, L., HARASZI, R., SZIGETI, J., SZOBOSZLAI, N. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 71(2) p. 683-690, 2007
- ANDERSON, R. A.; Nutritional role of chromium. *Sci. Total Environ.*, v. 17, p. 13, 1981.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), Peer-verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA, USA, 1993.
- ARNAUD, J. e FAVIER, A. Copper, iron, manganese and zinc contents in human colostrum and transitory milk of French woman. *Sci. Total Environ.* 159, p. 9-15, 1994.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological profile for chromium and compounds. 2000.
- AZEVEDO, F. A. e CHASIN, A. A. M. Metais: Gerenciamento da Toxicidade, Editora Atheneu, p. 554, 2003
- BARBOSA Jr., F.; SOUZA, S. S.; SANTOS Jr., D.; KRUG, F. J.; Evaluation of electrodeposited of chromium in urine by ETAAS. *Microchemical Journal*, v. 78, p. 7, 2004.
- BOCCA, B.; ALIMONTI, A.; CONI, E.; DI PASQUALE, M.; GIGLIO, L.; BOCCA, A. P.; CAROLI, S. Determination of the total content and binding pattern of elements in human milk by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, 53, p. 295 – 303, 2000.

- CALDAS, N.M., AMORIM, V.R. GOMES NETO, J.A., Direct and simultaneous determination of As, Cu, and Pb in Brazilian sugar cane spirits by graphite furnace AAS using Tungsten permanent modifier with Co-injection of Pd/Mg(NO₃)₂. *Atomic Spec.* 28(5), p. 189-194, 2007.
- CAMPOS, R. C.; Utilização de modificadores permanentes em GFAAS. Livro de Resumo do VII Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos. Campinas, p. 31, outubro de 2000.
- CEZARD, C.; MAGUENOER, J.M. Toxicologie du plomb chez l'homme. Paris: Lavoisier Tec. & Doc, p. 331, 1992.
- CHEN, J.R., XIAO, S.M., WU, X.H., FANG, K.M., LIU, W.H. Determination of lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. *Talanta* 67(5), p.992-996, 2005.
- DANA, JAMES D.. Manual de mineralogia. revisto por Cornelius S. Hurlbut Jr.; tradução de Rui Ribeiro Franco. Rio de Janeiro: 1969.
- DANKS, D.M. Disorders of copper transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 7th edn. New York: McGraw-Hill, 1995.
- EDIGER, R. D.; PETERSON, G. E.; KERBER, J. D.; Application of the graphite furnace to saline water analysis; *At. Absorpt. Newsl.*, v. 13, p. 61, 1974.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), GUIDANCE for Methods Development and Methods Validation for the RCRA Program SW-846 Methods, 1992.
- EURACHEM GUIDE - The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998
- FARIÑAS, M. V.; GARCÍA, B. J.; MARTÍN, S. G.; R. CRECENTE, R. P.; LATORRE, C. H.; Direct determination of cadmium in Orujo spirit samples by

- electrothermal atomic absorption spectrometry: Comparative study of different chemical modifiers. v. 591, p. 231, 2007.
- FERREIRA, A . D. Q. Impacto do crômio nos sistemas biológicos. Quím. Nova, v. 25, p. 572, 2002.
- FLORES, A. V.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z.; Evaluation of zirconium as a permanent chemical modifier using synchrotron radiation and imaging techniques for lithium determination in sediment slurry samples by ET AAS. Talanta, v. 62, p. 619, 2004.
- GOUVÊA, L.C. Aleitamento materno. In: NÓBREGA, F.J. (editor). Distúrbios da nutrição. Rio de Janeiro: Revinter , p. 15-31, 1998.
- HUA, K.M.; KAY, M.; INDYK, H.E. Nutritional element analysis in infant formulas by direct dispersion and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. Food Chem., 68, p. 463 – 470, 2000.
- HUSÁKOVA, L. RÁMKOVA, J., ÈERNOHORNKÝ, T., BAOINOVA, M. Direct Determination of Cd and Pb in Human Urine by GFAAS with Deuterium-lamp Background Correction Using Different Chemical Modifiers. Chem. Anal (Warsaw) 52, 2007.
- ILZSG (International Lead and Zinc Study Group). End uses of lead. Disponível em: <http://www.ilzsg.org/>. Acessado em junho de 2008.
- INMETRO DOQ-CGCRE-008: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, 2003.
- JENSEN, R.G. Handbook of Milk Composition. Ed. Academic Press, San Diego, California, 1995.
- KEEN. C. L.; ZIDENBERG-CHER, S.; BROWN, M.; Manganese. Ed. Present knowledge in nutrition, 6ª edição, Washington, DC: International Life Sciences Institute Nutrition Foundation, p. 279, 1990.

- KOURY, JOSELY C., OLIVEIRA, CYNTIA F. de, DONANGELO, CARMEN C. Associação da concentração plasmática de cobre com metaloproteínas cobre-dependentes em atletas de elite. *Rev Bras Med Esporte*.13(4), 2007.
- LEONE, C.R. Alimentação do recém-nascido de baixo peso. PRONAP–SBP. São Paulo. Ciclo III, n4, p.65-95, 1999.
- MAGALHAES, C. G. ; Lelis, K. L. A. ; SILVA, J. B. B. OU DA SILVA, J.B.B . Direct determination of copper and chromium in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using ruthenium as permanent. *Anal. And Bioanal. Chem.*, v. 374, p. 1301, 2002.
- MANNAN, A.; WAHEED, S.; AHMAD, S.; QURESHI, I.H. Dietary evaluation of toxic elements through integrated diet. *J. Radioanal. Nuclear Chem.*, v.162, n. 1 p.111-123, 1992.
- MARTINO, F.A.R.; SÁNCHEZ, M.L.F.; SANZ-MEDEL, A. The potencial of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in OMSle milk, skimmed milk and milk whey of different milks. *Anal. Chim. Acta*, 442, p. 191 - 200, 2001.
- MARTINS, I.; LIMA, I. V.; *Ecotoxicologia do manganês e seus compostos*. Salvador: CRA, 2001.
- MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-BERBEKE, J. “Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A”. v. 20A, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1998.
- MCKINSTRY, P.J.; INDYK, H.E.; KIM, N.D. The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). *Food Chem.*, 65, 245 – 252, 1999.
- MINAMI, T., SOHRIN, Y. UEDA, J. Determination of Chromium, Copper and Lead in River Water by Graphite-Furnace Atomic Absorption Spectrometry after Coprecipitation with Terbium Hydroxide. *Analytical Sciences* 21(12), 2005.

- MOREIRA, R. C. A.; BOAVENTURA, G. R. Referência geoquímica regional para a interpretação das concentrações de elementos químicos nos sedimentos da Bacia do Lagoa Paranoá –DF. Quím. Nova, v. 26, p. 812, 2003.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. “Reponse surface methodology”. Wiley: New York, 2002.
- NBR ISO/IEC 9000:2000 Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, E. S.; BRUNS, R. E. “Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria”. 3 Ed, Editora da Unicamp, Campinas, 2003.
- NÓBREGA, J.A.; GELINAS, Y., KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.M. Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom., 12, p. 1243 – 1246, 1997.
- NRC; Recommended dietary allowances. Washington, DC: National Research Council. 3ª edição, p. 231, 1989.
- OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. Atheneu Editora São Paulo, 1ª edição, São Paulo, p. 135, 1996.
- OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; Tungsten permanent chemical modifier with co-injection of $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ for direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Food Chem., v. 105, p. 236, 2007.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/UNICEF. Proteção, promoção e apoio ao aleitamento. O papel especial dos serviços materno-infantis. Genebra. OMS – 1989.

- PEREIRA, L. A.; AMORIM, I. G.; SILVA, J. B. B.; Development of methodologies to determine aluminum, cadmium, chromium and lead in drinking water by ET AAS using permanent modifiers. *Talanta*, v. 64, p. 395, 2004.
- PEREIRA, L.A., BORGES, S.S. de O, CASTRO, M. C., NETO, W.B., WINDMÖLLER, C.C., da SILVA, J.B.B. Determination of manganese and nickel in slurry sampling by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Can. J. Chem.* 86(4), p. 312–316, 2008.
- PINTO, F. G.; ANDRADA, D.; MAGALHÃES, C. G.; NUNES, B. R.; AMORIM, F. R.; FRANCO, M. B.; SAINT'PIERRE, T. D.; SILVA, J. B. B.; CURTIUS, A. J.; Determination of selenium in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using zirconium plus rhodium with co-injection of rhodium as chemical modifiers. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 383, p. 825, 2005 .
- SANTOS, D.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NEVES, E.F.A.; CAVALHEIRO, D.T.G.; NÓBREGA, J.A. Analysis of inorganic constituents in milk and simulation of CFAC reagent. *Eclét. Quim.*, 27, p. 61 – 76, 2002.
- SHUTTLE, I.; FEUERSTEIN, M.; SCHLEMMER, G.; Long –term stability of a mixture Pd-Ir trapping reagent for in situ hydride trapping within a graphite electrothermal atomizer. *J. Anal. At. Spectrom.*, v.7, p. 1299, 1992.
- SILVA, J. B. B.; Emprego de modificadores permanentes em espectrometria de absorção atômica em forno de grafite – uma revisão de aplicações, limitações e realidades. Livro de Resumo do VII Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos. Campinas, p.119, outubro de 2000.
- SILVA, J. B. B.; GIACOMELLI, M. B. O.; SOUZA, I. G.; CURTIUS, A.; J. Iridium and rhodium as permanent chemical modifier for the determination of Ag, As, Bi, Cd and Sb by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 60, p. 249, 1998.
- SILVA, J. B. B.; SILVA, M. A. M.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; Determination of Ag, Pb and Sn in aqua regia extracts from sediments by electrothermal atomic absorption

- spectrometry using Ru as permanent modifier. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 14, p. 1737, 1999.
- SILVEIRA, J.N.; LARA, P. C.; DIAS, M. B.; NASCENTES, C.; DEMICHELI, C.; SILVA, J. B. B. OU DA SILVA, J.B.B . A Simple and Fast Method for Manganese Determination in Anti-hypertensive Drugs by Slurry Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Letters*, v. 40, p. 1736-1749, 2007.
- SILVEIRA, J.N. ; LARA, P. C. ; DIAS, M. B. ; NASCENTES, C. ; DEMICHELI, C. ; SILVA, J. B. B. OU DA SILVA, J.B.B . A Simple and Fast Method for Manganese Determination in Anti-hypertensive Drugs by Slurry Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Letters*, v. 40, p. 1736-1749, 2007.
- SILVESTRE, M.D.; LAGARDA, M.J.; FARRÉ, R.; MARTINEZ-COSTA, C.; BRINES, J. Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. *Food Chemistry*, v. 68, 2000.
- SIQUEIRA, M. E. P. B.; Avaliação do ácido homovanílico urinário e da adenosina desaminase plasmática como índice de exposição ocupacional ao manganês. 243 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984
- SKOOG, DOUGLAS A., HOLLER, F. JAMES, NIEMAN, TIMOTHY A. Princípios de Análise Instrumental. Bookman, 5ª Edição. 2002
- STATSOFT. Statistica 6.0 for Windows, StatSoft, Inc 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, USA, 2001
- TELISMAN S. Interactions of essential and/or toxic metals and metalloids regarding interindividual differences in susceptibility to various toxicants and chronic diseases in man. *Arh Hig Rada Toksikol* 46(4):459-76, 1995
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um Tutorial, *Quim. Nova* v. 29, p. 338, 2006.

TIMBRELL, J.A. Introduction to toxicology. 2.ed. London: Taylor & Francis, p.76-77, 111-114, 1995.

VICTORA, C.G.; SMITH, P.G.; VAUGHAN, J.P.; NOBRE, L.C.; LOMBARDI, C.; TEIXEIRA, A.M. Evidence for protection by breast-feeding against infant deaths from infections dislases in Brazil. New York, Lancet; 2(8554), p.319-22, 1987.

WEDLER, F. C.; KLIMIS-TAVANTIZIS, D. J.; Biochemical and nutritional role of manganese. Ed. Manganese in Health and Disiase. Boca Raton, L.A. Impresso CRC, p. 1, 1994.

WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R.; Palladium nitrate magnesium-nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5: Performance for determination of 21 elements, J. Anal. At. Spectrom., v. 7, p. 1257, 1992.

WELZ, B.; SPERLING, M. "Atomic Absorption Spectrometry" 3 Ed, Wiley-VHC, Germany, 1999.

OMS (World Health Organization) IPCS (Internacional Programme on Chemical Safety): Environmental Healthy Criteria 165 – Inorganic Lead. Genebra. 1995.

OMS (World Health Organization). Manganese. Environmental Healthy Criteria 17. Genebra. 1981.

OMS CDD. Breastfeeding Counselling: a training course-update – n.14. Geneva, 1994.