Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Flávia Regina de Amorim

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM LEITES E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES SEM PRÉVIA DECOMPOSIÇÃO

Belo Horizonte
2010

UFMG/ICEx/DQ.819ª
T.347ª

Flávia Regina de Amorim

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM LEITES E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES SEM PRÉVIA DECOMPOSIÇÃO

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química

Belo Horizonte
2010

A524d
2010
T

Amorim, Flávia Regina de
Desenvolvimento de métodos espectrométricos para a determinação de constituintes inorgânicos em leites e alimentos infantis similares sem prévia decomposição / Flávia Regina de Amorim. 2010.
140 f. : il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientador: José Bento Borba da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
Bibliografia: f. 132-140.

1. Química Analítica - Teses 2. Alimentos - Análise – Teses 3. Preparação de amostra (Química) – Teses 4. Espectroscopia de absorção atômica – Teses 5. Análise multivariada – Teses 6. Leite – Teses 7. Compostos inorgânicos - Teses I. Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora II. Silva, José Bento Borba da, Coorientador III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br

"Desenvolvimento de Métodos Espectrométricos para a Determinação de Constituintes Inorgânicos em Leites e Alimentos Infantis Similares sem Prévia Decomposição"

Flávia Regina de Amorim

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG

Prof. José Bento Borba da Silva - Co-Orientador
UFMG

Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda
UNICAMP

Prof. Júlio César José da Silva
UFJF

Profa. Maria José de Sousa Ferreira da Silva
UFMG

Profa. Letícia Malta Costa
UFMG

Belo Horizonte, 11 de junho de 2010.

Ao Senhor dos Exércitos, Deus do céu e da terra.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus amado, por conceder-me a prova da Sua existência sem que eu mereça, pelo Seu caráter perfeito e pelos inúmeros milagres incessantes derramados em minha vida desde o instante em que passei a existir.

À professora Dra. Clésia Cristina Nascentes, pela sua dedicação e orientação neste trabalho, pela amizade, paciência e especialmente pela compreensão em todos os meus momentos difíceis.

Ao professor Dr. José Bento Borba da Silva, pela dedicação consumida neste trabalho, pelo apoio e pelos momentos de aprendizado e especialmente pela amizade.

Ao Dr. Milton Batista, pela colaboração e pela oportunidade concedida de execução de parte deste trabalho em instalações do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN); à equipe do Laboratório de Absorção Atômica desta Instituição e aos demais colaboradores Dra. Helena Palmieri e Dra. Maria Ângela Menezes. Gostaria de deixar meus sinceros agradecimentos ao CDTN/CNEN, por todo este tempo de acolhimento e disponibilização de recursos para a execução deste trabalho.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento deste trabalho e à Secretaria de Pós-graduação, por todo apoio concedido.

A todos os colegas de laboratório, do CDTN/CNEN e do Grupo de Espectrometria Atômica e Preparo de Amostras (GEAPA), pois compartilhamos muitos momentos nesta caminhada. Agradeço pela oportunidade de convivermos juntos, criando e estreitando laços de amizade.

Agradeço aos professores da banca examinadora pela participação e pelas contribuições neste trabalho.

A todos os meus familiares, especialmente Isabela, minha irmã e companheira de vida, Gustavo, meu sobrinho amado, aos meus avós, por tudo que fizeram por mim. Sem eles eu não chegaria onde estou.

Aos amigos do Benzeno, dos quais nunca me esquecerei: Alice, Adriane, Claudir Cristiano, Josiane e Leonardo.

A todos que estiveram presentes em minha vida, nesta caminhada, que contribuíram direta ou indiretamente para essa vitória. Seus nomes não estão gravados nestas páginas, mas estão gravados em meu coração.

A meu esposo Flamarion, companheiro amado, por seu amor, seu apoio, sua imensa compreensão em todos os momentos em que estive ausente e por compartilhar e dividir comigo os momentos dessa caminhada.

“À medida que cada ave bate suas asas, ela cria um vácuo que serve de sustentação para a ave seguinte. Voando em formato de “V”, o grupo consegue voar, com pelo menos 71% a mais de aproveitamento, do que se cada ave voasse isoladamente.” Autoria desconhecida

RESUMO

Neste trabalho são propostos métodos para determinação sem prévia decomposição de Al, Cr, Mn e Mo por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) e de Zn por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) em amostras de leite e alimentos infantis similares, empregando amostragem de suspensões. Paralelamente, foram realizadas análises por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), com o intuito de avaliar a composição das amostras em relação aos constituintes inorgânicos. As análises multielementares (ICP-MS) revelaram a existência de grandes variações na composição das amostras, principalmente das fórmulas infantis. No desenvolvimento de métodos para determinação por GFAAS, as amostras de leite e similares foram submetidas a um procedimento simples e rápido, a solubilização em água deionizada e sonicação por 10 a 50 minutos, para estabilização das suspensões. Os métodos foram estabelecidos a partir da escolha de modificadores permanentes adequados e da otimização multivariada para obtenção do programa de aquecimento. Os modificadores permanentes Zr, Rh e Ir foram utilizados na determinação de Al, Cr e Mn, respectivamente, e Eu + Nb para Mo. Na otimização, as temperaturas de pirólise e atomização, bem como o tempo de pirólise foram determinados para cada método. Nas condições experimentais otimizadas todos os parâmetros analíticos de mérito avaliados foram considerados adequados, como massa característica, exatidão e precisão. Amostras de leite integral, leite desnatado, bebida láctea, fórmula infantil, alimento a base de soja e leite de cabra foram analisadas de acordo com os métodos propostos e as concentrações obtidas variaram dentro de uma ampla faixa. No desenvolvimento do método para determinação de Zn por FAAS, as amostras de leite e similares também foram tratadas por solubilização em água deionizada e sonicação por 10 a 50 minutos, para estabilização das suspensões, e foram posteriormente diluídas adequadamente. As curvas de calibração revelaram ausência de efeitos de matriz, o que levou a proposição de um método rápido, simples e com características analíticas adequadas. Nas análises realizadas (GFAAS e FAAS) foi possível perceber que algumas amostras apresentaram concentrações em níveis acima do recomendado para Zn, Cr e Mn e níveis alarmantes para Al.

Palavras-chave: Leite e alimentos infantis. Amostragem em suspensão. Espectrometria atômica. Constituintes inorgânicos. Otimização multivariada.

ABSTRACT

In this work methodologies were proposed to determination of Al, Cr, Mn and Mo by GFAAS and Zn by FAAS in milk and similar samples treated with only solubilization in water and sonication. In the same time, determination by ICP-MS was accomplished with the intention of evaluating the mineral composition of the samples. The multielemental analyses (ICP-MS) revealed the existence of great variations in the compositions of the samples, mainly of infant formula. In the development of methods for determination by GFAAS, the milk and similar samples were treated through a simple and fast method, the solubilization in ultra-pure water and sonication for 10 to 30 minutes, to stabilization of the suspensions. Methods were established from the choice of suitable permanent modifiers and multivariate optimization to obtain the heating program. The permanent modifiers Zr, Rh and Ir were used in the determination of Al, Cr and Mn, respectively, and Eu + Nb for Mo. In optimization step the pyrolysis and atomization temperatures and the pyrolysis time were determined for each method. In the optimized experimental conditions the analytical parameters of merit were assessed as adequate, as characteristic mass, accuracy and precision. Whole milk, skim milk, milk beverage, infant formula, soy-based food and goat milk were analyzed according to the methods proposed and the concentrations obtained varied over a wide range. In the development of methods for determination of Zn by FAAS, the samples were also treated for solubilization in ultra-pure water and sonication for 10 to 30 minutes, for stabilization of the suspensions, and later diluted adequately. The calibration curves revealed absence of matrix effects, which took the proposition of a method fast, simple and with characteristics appropriate analytics. In all the accomplished analyses (GFAAS and FAAS) it was possible to notice that some samples had concentrations above recommended levels of Zn, Cr and Mn and alarming levels of Al.

Keywords: Milk and infant foods. Slurry sampling. Atomic spectrometry. Inorganic constituents. Multivariate optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Dendrograma das amostras obtido pela HCA usando método de Ward. ... 57

Figura 5.1 Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário (TP: temperatura de pirólise; TA: temperatura de atomização; t: tempo de duração da pirólise) utilizado na otimização do método para determinação de Al em leites e similares. 77

Figura 5.2 Superfície de resposta obtida no primeiro planejamento Doehlert utilizado na otimização do método para determinação de Al em leites e similares. Os valores estão codificados. 79

Figura 5.3 Superfície de resposta obtida no segundo planejamento Doehlert. Os valores estão codificados. 80

Figura 5.4 Curvas de pirólise e atomização obtidas univariadamente para Al em leite usando Zr como modificador permanente. 82

Figura 5.5 Perfil do pico obtido usando W como modificador permanente, nas condições recomendadas (TP = 1650º C e TA = 2500°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1 fortificada com 30 μg L^{-1} de Cr. 90

Figura 5.6 Perfil do pico obtido usando Ru como modificador permanente, nas condições recomendadas (TP = 1650º C e TA = 2500°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1 fortificada com 30 μg L^{-1} de Cr. 91

Figura 5.7 Perfil do pico obtido usando Rh como modificador permanente, nas condições recomendadas (TP = 1650º C e TA = 2500°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1 foritficada com 30 μg L^{-1} de Cr. 91

Figura 5.8 Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário (TP: temperatura de pirólise; TA: temperatura de atomização; t: tempo de pirólise) na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS. 92

Figura 5.9 Gráfico de Pareto obtido pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS, mostrando os efeitos estimados das variáveis: TP, temperatura de pirólise; TA, temperatura de atomização; t, tempo de pirólise, Q, interação quadrática, L, interação linear. 95

Figura 5.10 Superfície de resposta e seus contornos obtidos pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS, fixando o tempo de pirólise em 52s. 96

Figura 5.11 Superfície de resposta e seus contornos obtidos pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS, fixando a temperatura de atomização em 2512°C. 97

Figura 5.12 Gráfico de contorno da superfície de resposta do módulo da absorção de fundo, obtido na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares

por GFAAS, fixando o tempo de pirólise em 52s. 97

Figura 5.13 Perfil do pico obtido para Mn sem modificador, nas condições recomendadas (TP = 1300º C e TA = 2300°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1. 105

Figura 5.14 Perfil do pico obtido para Mn usando Ir como modificador, nas condições recomendadas (TP = 1300º C e TA = 2300°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1. 106

Figura 5.15 Gráfico de Pareto obtido na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS, mostrando os efeitos das variáveis: temperatura de pirólise (TP), temperatura de atomização (TA), e, tempo de duração da etapa de pirólise. 107

Figura 5.16 Gráfico de Pareto obtido pelo CCD na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS, mostrando os efeitos estimados das variáveis: temperatura de pirólise (TP), temperatura de atomização (TA), tempo de pirólise (t), interação quadrática (Q), interação linear (L). 109

Figura 5.17 Superfície de resposta obtida do CCD para otimização das condições para determinação de Mn em leites e similares (TP, temperatura de pirólise; TA, temperatura de atomização). 110

Figura 5.18 Gráfico de contorno da superfície de resposta obtida na otimização das condições para determinação de Mn em leites e similares. 111

Figura 5.19 Gráfico de contorno da superfície de resposta módulo da absorção de fundo obtida na otimização das condições para determinação de Mn em leites e similares. 111

Figura 5.20 Curvas de pirólise e atomização obtidas univariadamente para Mn em leite usando Ir como modificador permanente. 112

Figura 5.21 Perfil de pico obtido empregando európio (a) e európio com nióbio permanente (b) como modificadores em amostra composta não-fortificada com Mo.. 122

Figura 5.22. Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial empregado para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS (TP, temperatura de pirólise; TA, temperatura de atomização; t, tempo de pirólise)... 123

Figura 5.23 Superfície de resposta e seus contornos obtidos do CCD empregado na otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS... 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Parâmetros operacionais empregados na determinação de elementos em leite em pó e alimentos infantis similares por ICP-MS. 46

Tabela 3.2 Amostras em pó de leite e outros alimentos infantis similares analisadas e codificação utilizada. 48

Tabela 3.3 Programa de aquecimento utilizado para decomposição assistida por micro-ondas das amostras de leite e alimentos infantis similares. 49

Tabela 3.4 Equações de regressão, coeficientes de correlação linear (r) e limites de detecção obtidos para as curvas de calibração do ICP-MS. 50

Tabela 3.5 Resultados de determinação dos metais em materiais de referência certificados por ICP-MS (n=3). 51

Tabela 3.6. Resultados obtidos na quantificação de constituintes inorgânicos em alimentos infantis por ICP-MS. 53

Tabela 4.1 Condições instrumentais utilizadas na determinação de Zn em amostras de leite e similares por FAAS. 59

Tabela 4.2 Resultados da calibração através de curvas de adição de analito e curvas aquosas para as amostras compostas. 62

Tabela 4.3 Características de desempenho do método empregado na determinação de Zn em amostras de leite. 64

Tabela 4.4 Exatidão obtida através da comparação do método proposto com método de determinação de Zn por ICP-MS após decomposição ácida em micro-ondas. 64

Tabela 4.5 Concentrações de zinco em amostras de leite e alimentos infantis similares determinadas pelo método proposto e sua contribuição na ingestão deste micronutriente. 66

Tabela 5.1 Condições instrumentais recomendadas pelo fabricante e empregadas no desenvolvimento dos métodos para a determinação de Al, Cr, Mn e Mo por GFAAS.. 67

Tabela 5.2 Programa de temperatura utilizado para recobrimento dos tubos de grafite, adaptado (SILVA et al., 1998). 70

Tabela 5.3 Programa de temperatura usado na otimização do método para determinação de Al em leite e alimentos infantis similares. 72

Tabela 5.4 Níveis estudados no planejamento fracionário empregado na otimização do método para determinação de Al em leite e similares. 73

Tabela 5.5 Níveis estudados no primeiro planejamento Doehlert empregado na otimização do método para determinação de Al em leite e similares. 73

Tabela 5.6 Níveis estudados no segundo planejamento Doehlert empregado na otimização do método para determinação de Al em leite e similares. 73

Tabela 5.7 Resultados obtidos o planejamento fatorial fracionário utilizado na otimização do método para a determinação de Al em leites e similares (n = 2). 76

Tabela 5.8 Resultados do primeiro planejamento Doehlert utilizado na otimização do método para a determinação de Al em leites e similares por GFAAS. 78

Tabela 5.9 Resultados do segundo planejamento Doehlert utilizado na otimização do método para a determinação de Al em leites e similares por GFAAS. 80

Tabela 5.10 Resultados obtidos na avaliação do efeito de matriz na determinação direta de Al em leite e amostras similares por GFAAS. 83

Tabela 5.11 Características de desempenho do método otimizado para determinação de Al em leites e similares por GFAAS, empregando calibração aquosa. 84

Tabela 5.12 Concentrações de Al em diferentes amostras de leite e similares obtidas pelo método proposto. 86

Tabela 5.13 Programa de aquecimento usado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS. 88

Tabela 5.14 Níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} empregado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS. 88

Tabela 5.15. Níveis estudados no CCD empregado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS. 88

Tabela 5.16. Resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário empregado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS. 92

Tabela 5.17 Resultados obtidos no planejamento composto central na otimização do método para determinação de Cr em leite e alimentos similares por GFAAS. 94

Tabela 5.18 Pontos observados pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leites e similares por GFAAS. 96

Tabela 5.19 Resultados da calibração através das curvas de adição de analito para as amostras compostas e curvas aquosas na avaliação do efeito de matriz na determinação de Cr em leite e similares pelo método otimizado. 98

Tabela 5.20 Características de desempenho do método otimizado para a determinação de Cr em leites e similares por GFAAS. 99

Tabela 5.21 Concentrações de cromo em leite e alimentos infantis similares..... 101

Tabela 5.22 Programa de temperatura usado na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS. 103

Tabela 5.23 Níveis estudados no planejamento fatorial fracionário para otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS..... 103

Tabela 5.24 Níveis estudados no CCD para otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS. 104

Tabela 5.25 Resultados do planejamento fatorial fracionário empregado na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS. 107

Tabela 5.26 Resultados obtidos no CCD empregado na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS. 108

Tabela 5.27 Resultados da calibração através de curvas de adição de analito para as amostras compostas e curvas aquosas na avaliação do efeito de matriz na determinação de Mn em leite e similares pelo método otimizado. 113

Tabela 5.28 Características de desempenho do método otimizado para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS. 114

Tabela 5.29 Concentração de Mn em diferentes amostras de leite e similares pelo método proposto. 116

Tabela 5.30 Programa de temperatura usado na otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS. 118

Tabela 5.31 Níveis estudados no planejamento fatorial para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS. 119

Tabela 5.32 Níveis estudados no CCD para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS. 119

Tabela 5.33 Avaliação de modificadores para a determinação de Mo em leites e similares empregando a amostra não-fortificada nas condições do fabricante. 121

Tabela 5.34 Resultados obtidos no planejamento fatorial empregado para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS. 123

Tabela 5.35 Resultados obtidos no planejamento composto central (CCD) empregado na otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS. 124

Tabela 5.36 Características de desempenho do método otimizado para a determinação de Mo em leites e similares por GFAAS. 127

Tabela 5.37 Concentrações de molibdênio em leite e alimentos infantis similares. 129

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Classificação dos minerais em leite humano e animal (adaptado). 21

Quadro 1.2. Composição aproximada (% m/m) de leite humano, bovino, de cabra e de ovelha. 27

Quadro 1.3. Ingestão diária recomendada (IDR) de zinco em função da faixa etária. 30

Quadro 1.4. Concentração média de Zn em vários grupos de alimentos. 31

Quadro 1.5. Ingestão diária recomendada (IDR) em função da faixa etária. 37

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês *"atomic absorption spectrometry"*
ANOVA	Análise de Variância, do inglês *"analysis of variance"*
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças, do inglês *"Agency for Toxic Substances and Disease Registry"*
CCD	Planejamento composto central, do inglês *"central composite design"*
CDTN/CNEN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear
CTAC	Cloreto de Cetil Trimetil Amônio, do inglês "*Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride"*
DPR	Desvio Padrão Relativo
EPA	Agência de Proteção Ambiental, do inglês *"Environmental Protection Agency"*
ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, do inglês *"electrothermal atomic absorption spectrometry"*
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama, do inglês *"flame atomic absorption spectrometry"*
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês *"graphite furnace atomic absorption spectrometry"*
HCA	Análise de agrupamentos hierárquicos, do inglês *"hierarchical cluster analysis"*
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica, do inglês *"International Atomic Energy Agency"*
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *"inductively coupled plasma optical emission spectrometry"*
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *"inductively coupled plasma mass spectrometry"*
IDR	Ingestão Diária Recomendada
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês "*International Union of Pure and Applied Chemistry"*
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês *"National Institute of Standards Technology*"
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFA	Polifluoralcoxi
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA
SRM	Material de referência, do inglês *"standard reference material"*
STPF	Forno com platafoma e temperatura estabilizada, do inglês *"stabilized temperature platform furnace"*
TA	Temperatura de atomização
THGA	Atomizador de grafite aquecido transversalmente, do inglês "transversely *heated graphite atomizer"*
TP	Temperatura de pirólise
TS-FF-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno na Chama e Aerossol Térmico, do inglês *"thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry*"
UHT	Temperatura extremamente alta, do inglês *"ultra high temperature"*

LISTA DE ABREVIATURAS

apud	citado por (latim)
et al	e outros, do latim *"et alli"*
etc.	e outros, do latim *"et cetera"*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO 20

1.1 LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES 20
1.1.1 Leite 21
1.1.2 Outras fórmulas comerciais 22
1.1.2.1 Bebida láctea 22
1.1.2.2 Fórmulas infantis 23
1.1.2.3 Alimento com soja 23
1.1.2.4 Alimentos enriquecidos 24
1.2. QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS 25
1.2.1 Quantificação de constituintes inorgânicos em leite e similares por técnicas multielementares 28
1.2.2 Quantificação de zinco em leite e similares por FAAS 29
1.2.3 Quantificação de alumínio, cromo, manganês e molibdênio em leite e similares por GFAAS 32
1.2.3.1 Alumínio 34
1.2.3.2 Cromo 35
1.2.3.3 Manganês 37
1.2.3.4 Molibdênio 39
1.3. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS 41
1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 42

CAPÍTULO II. OBJETIVOS 44

CAPÍTULO III. DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES POR ICP-MS 45

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS 45
3.1.1 Instrumentação 45
3.1.2 Reagentes e materiais certificados 46
3.1.3 Amostras 47
3.1.4 Decomposição assistida por radiação micro-ondas 48
3.2.5 Análise por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) 49
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
3.2.1 Desempenho analítico do ICP-MS 50
3.3.2 Análise das amostras de leite e alimentos similares 52

CAPÍTULO IV. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES POR FAAS 59

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS 59
4.1.1 Instrumentação e reagentes 59
4.1.2 Amostras 60
4.1.3 Avaliação do desempenho do método 61
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
4.2.1 Características de desempenho do método 61
4.2.2 Aplicação do método 65

CAPÍTULO V. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES POR GFAAS 67

5. 1 MATERIAIS E MÉTODOS 67
5.1.1 Instrumentação *67*
5.1.2 Materiais, reagentes e materiais de referência certificados *68*
5.1.3 Amostras *69*
5.1.4 Tratamento dos tubos de grafite com modificadores permanentes *70*
5.1.5 Otimização das condições analíticas *70*
5.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO 71
5.2.1 Otimização das condições analíticas *71*
5.2.2 Parâmetros de mérito *74*
5.2.3 Resultados e discussão *75*
5.2.3.1 Otimização das condições analíticas 75
5.2.3.2 Parâmetros de mérito 82
5.2.3.3 Aplicação do método 85
5.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CROMO 87
5.3.1. Otimização das condições analíticas *87*
5.3.2. Parâmetros de mérito *89*
5.3.3. Resultados e discussão *90*
5.3.3.1 Otimização das condições experimentais 90
5.3.3.2 Parâmetros de mérito 98
5.3.3.3 Aplicação do método 100
5.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS 102
5.4.1 Otimização das condições analíticas *102*
5.4.2. Parâmetros de mérito *104*
5.4.3 Resultados e discussão *105*
5.4.3.1 Otimização das condições experimentais 105
5.4.3.2 Parâmetros de mérito 112
5.4.3.3 Aplicação do método 115
5.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO 117
5.5.1. Otimização das condições analíticas *117*
5.5.2 Parâmetros de mérito *119*
5.5.3 Resultados e discussão *119*
5.5.3.1 Otimização das condições analíticas 119
5.5.3.2 Parâmetros de mérito 126
5.5.3.3 Aplicação do método 127
CAPÍTULO VI. CONCLUSÕES 130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 132

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico e industrial tem aumentado e estimulado significativamente a produção e o consumo em diversas áreas, especialmente na área de alimentos. Atualmente, existem inúmeros produtos alimentícios industrializados para atender aos mais diversos tipos de demanda: alimentos para diabéticos, anêmicos, bebês, idosos, dietas especiais, atletas, gestantes, para viagem, preparo rápido, prontos para consumo e longa vida.

A fortificação[1] de alimentos é importante no combate às deficiências nutricionais. Por outro lado, as etapas de processamento, a fortificação e a existência de diversas formulações empregando diferentes matérias-primas aumentam a possibilidade da inserção de espécies indesejáveis na composição do produto. Além disso, a interação entre os constituintes dos alimentos deve ser avaliada, pois o excesso de certos nutrientes pode levar à deficiência de outros (LOBO; TRAMONTE, 2004) e tanto a deficiência como o excesso podem ser extremamente maléficos. Neste aspecto, os alimentos infantis merecem atenção especial, por se tratarem de alimentos para consumidores com sistema imunológico em desenvolvimento e, portanto, são mais susceptíveis aos efeitos nocivos relativos ao excesso ou falta de nutrientes, bem como à presença de elementos tóxicos. Assim, o controle de qualidade adequado destes produtos alimentícios é de grande importância. Neste contexto, a quantificação de constituintes inorgânicos em alimentos é necessária para garantir a manutenção da qualidade do alimento.

1.1 LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES

O leite e os laticínios são importantes componentes da dieta humana, desde a infância até a velhice. A infância é, provavelmente, o período da vida em que a

[1] Fortificação ou enriquecimento de alimentos é a adição de um ou mais nutrientes essenciais, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo, prevenir ou corrigir a deficiência em um ou mais nutrientes (ANVISA, 1988).

demanda nutricional é maior, havendo necessidade de grandes quantidades de minerais. Nesta fase, é importante uma ingestão suficiente de minerais, caso contrário podem surgir doenças e um desenvolvimento anormal da criança (CHANDRA, 1988). Muitos produtos que fazem parte da dieta e contribuem para a entrada dos nutrientes inorgânicos no organismo podem ser citados: leite, alimentos à base de leite, alimentos com soja, fórmulas infantis, alimentos enriquecidos, entre outros.

1.1.1 Leite

O leite, por definição de ZENEBON e PASCUET (2005) é, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies de animais deve conter o nome da espécie de que proceda. É um dos alimentos mais saudáveis, sendo rico em vários nutrientes: vitaminas, minerais essenciais e proteínas. O Quadro 1.1 apresenta a concentração dos nutrientes em leites obtidos de diferentes animais e leite humano. O consumo de leite é importante e indicado para todas as idades (salvo em caso de restrição ou condições específicas), por ser também fonte de energia e a melhor fonte de cálcio. A ingestão adequada de cálcio vem sendo uma das principais estratégias alimentares para garantir um envelhecimento sadio e com menor risco a doenças degenerativas, comuns à terceira idade, como a osteoporose.

Quadro 1.1. Composição aproximada (% em massa) de leite humano, bovino, de cabra e de ovelha.

Componente	Humano	Bovino	Cabra	Ovelha
Proteína	1,0	3,4	2,9	5,5
Caseína	0,4	2,8	2,5	4,6
Gordura	3,8	3,7	4,5	7,4
Lactose	7,0	4,6	4,1	4,8
Minerais	0,2	0,7	0,8	1,0

Fonte: Jennes (1974) apud Jensen (1995)

O leite humano é o alimento mais completo para a criança nos primeiros seis meses de vida e deve ser fornecido até os dois anos, sendo responsável por prover todos os nutrientes necessários para o lactente e prevenir uma série de doenças pelo

seu elevado teor de anticorpos, salvo raras exceções. Segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), o leite materno deve ser o alimento exclusivo até o quarto ou sexto mês de vida. Porém, já no final do primeiro ano, a criança pode começar a receber outros tipos de alimentos, como, por exemplo, leite pasteurizado, longa vida e em pó, entre outros, todos na forma integral devido às necessidades calóricas características dessa fase (BRASIL, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001) .

1.1.2 Outras fórmulas comerciais

Diversas formulações comerciais têm sido produzidas com intuito de complementar ou substituir o leite, podendo ser à base deste ou à base de soja.

1.1.2.1 Bebida láctea

Existem formulações à base de leite comumente denominadas de bebida láctea. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na instrução normativa nº 16 de 23 de agosto de 2005, define-se bebida láctea como o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT[2], reconstituído, concentrado, em pó, integral, semi-desnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% em massa do total de ingredientes do produto. Obrigatoriamente a bebida láctea deve conter leite e soro de leite, podendo conter outros ingredientes como: creme, manteiga, proteínas lácteas e outros produtos de origem láctea e ingredientes opcionais não-lácteos como açúcares, glicídios, pedaços, polpa ou suco e outros preparados a base de frutas, mel, cereais, vegetais, chocolate, café e outros ingredientes. O termo 'leite modificado' também é utilizado para designar bebidas

[2] UHT é um processo térmico de tratamento do leite no qual se eleva a temperatura a cerca de 140 °C por um curto período de tempo com a finalidade de preservação do leite.

lácteas, porém este termo induz o consumidor a acreditar que o produto seja composto integralmente por leite. A rotulagem dessas bebidas segundo a legislação nacional vigente deve conter dizeres visíveis indicando que o produto não é leite (MAPA, 2005).

1.1.2.2 Fórmulas infantis

Lactente é "a criança de zero a doze meses de idade incompletos" (ANVISA, 1998b). Segundo o Ministério da Saúde (MS), considera-se **fórmula infantil** "o produto em forma líquida ou em pó, destinado a alimentação de lactentes, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite humano, para satisfação das necessidades nutricionais deste grupo etário; excetuam-se as fórmulas destinadas a satisfazer necessidades dietoterápicas específicas" (ANVISA, 1998b). A fórmula infantil pode apresentar-se nas formas líquida pronta para o consumo, não necessitando de diluição; líquida concentrada, necessitando de diluição em água, conforme instruções do fabricante ou em pó, necessitando de água para o preparo, de acordo com as instruções do fabricante.

1.1.2.3 Alimento com soja

Segundo a resolução RDC nº 91, de 18 de outubro de 2000 da ANVISA, alimento com soja é o produto cuja principal fonte de proteínas é a soja. Pode se apresentar como produto pronto para o consumo ou como produto que necessita de preparo para o consumo. A legislação específica proíbe a utilização da expressão "leite de soja" (ANVISA, 2000).

O alimento com soja deve conter obrigatoriamente um ou mais dos ingredientes: extrato de soja (integral e ou desengordurado), proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja, proteína texturizada de soja, outras fontes protéicas de soja, excluindo o farelo tostado de soja. Alguns ingredientes opcionais podem ser acrescentados: açúcares, mel, sal (cloreto de sódio), água, leite e derivados, ovos,

carnes e derivados, amidos e derivados, cereais e derivados, cacau e derivados, café, gorduras e óleos, coco e derivados, extrato de malte, polpas, sucos e concentrados de frutas, microorganismos para fins específicos e outros ingredientes isolados ou em combinação, que não descaracterizem o produto (ANVISA, 2000).

Os alimentos com soja exercem papel importante na alimentação de indivíduos com intolerância à lactose, suprindo algumas necessidades nutricionais em substituição ao leite (CASÉ et al., 2005).

1.1.2.4 Alimentos enriquecidos

Muitos alimentos podem ser enriquecidos, inclusive os acima citados, com a finalidade de melhorar seu conteúdo nutricional. Alimentos enriquecidos são alimentos que sofreram adição de nutrientes, vitaminas e minerais, para suprir a perda durante o processamento ou para atender um público alvo (crianças, idosos), ou fornecer um produto novo ou melhorado com alto valor nutricional. Esse produto deve atender a resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 (ANVISA, 2003) e a RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005). Segundo a Portaria 31 de 13/01/98 do Ministério da Saúde, considera-se **alimento fortificado/enriquecido** ou simplesmente adicionado de nutrientes "todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e/ou prevenir ou corrigir deficiência(s) demonstrada(s) em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma" (ANVISA, 1998). A indústria de alimentos tem evoluído grandemente no sentido de diversidade de produtos, sendo que atualmente existem produtos para vários tipos de dieta e para suprir diferentes tipos de necessidades nutricionais. Entretanto, um fator preocupante é a possível interação entre vários tipos de nutrientes, o que pode comprometer a biodisponibilidade dos minerais, levando a diversos males à saúde humana (GOYER, 1997; LOBO; TRAMONTE, 2004).

A legislação brasileira permite que os alimentos sejam fortificados com vitaminas e/ou sais minerais e/ou aminoácidos. Os seguintes minerais podem ser adicionados na forma elementar, de sal ou de composto de comprovada biodisponibilidade: cálcio, cobre, ferro, fósforo, iodo, zinco, selênio, molibdênio, cromo, flúor, manganês, magnésio e outros minerais cujo uso venha a ser recomendados pelo Codex Alimentarius (ANVISA, 1998).

Muitos requisitos devem ser seguidos, de forma que nenhuma substância nociva ou inadequada seja adicionada. As informações nos rótulos devem seguir as normas e/ou legislações específicas e, mais, a adição dos nutrientes deve ser criteriosa, de acordo com as resoluções RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 (ANVISA, 2003) e a RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005).

1.2. QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS

Íons metálicos estão presentes no ambiente e podem ser introduzidos nos alimentos a partir de fontes naturais ou por fontes antropogênicas. Sua importância para a saúde pode ser comprovada através da participação destes elementos em diversos processos metabólicos, seja como componentes enzimáticos, participando de sistemas redox, na ativação de enzimas, entre outros (ROJAS et al., 1999). Os íons metálicos se encontram presentes em todos os tipos de alimentos e são ingeridos pelo homem como parte da sua dieta. Muitos deles são nutrientes e desempenham papel fundamental na saúde humana, enquanto outros são extremamente tóxicos e sua presença é indesejável. Por exemplo, Cd, Pb, Hg e Al são considerados tóxicos enquanto Na, Fe, Se, Ca, Mg e Mn são considerados essenciais (GOYER, 1997), muitos dentro de uma limitada dose (FRANCO, 1992).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **nutriente** é "qualquer substância normalmente consumida como um constituinte do alimento e que fornece energia; ou é necessária para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da

saúde; ou cuja deficiência resulta em mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo"; **nutriente essencial** é "toda substância normalmente consumida para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e que não é sintetizada pelo organismo ou é sintetizada, porém em quantidade insuficiente" (ANVISA, 1998). Dentro desse contexto, muitos elementos que podem estar presentes nos leites humano e animal podem ser classificados como nutrientes ou nutrientes essenciais e, ainda, podem ser divididos em macrominerais[3], microminerais[4] essenciais e microminerais tóxicos (Quadro 1.2), embora a toxicidade e a essencialidade de cada espécie dependa de sua concentração. Os demais elementos são atualmente considerados contaminantes, mas sua categoria pode ser alterada futuramente devido às melhorias nas técnicas analíticas e na compreensão de suas funções no metabolismo biológico (JENSEN, 1995).

A quantificação de íons metálicos nos mais variados tipos de amostras (tecidos biológicos, água, solo, alimentos, etc.) constitui uma importante ferramenta para avaliar o grau de exposição e possíveis consequências para a saúde humana. Diversas técnicas analíticas encontram-se disponíveis para tal propósito, tais como a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS), a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) e a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), entre outras.

[3] Macrominerais são definidos aqui como íons metálicos que se apresentam como constituintes majoritários em leite humano e animal.
[4] Microminerais são definidos aqui como íons que se apresentam como constituintes em níveis de traços em leite humano e animal.

Quadro 1.2. Classificação dos minerais em leite humano e animal (adaptado).

Macrominerais	Microminerais essenciais	Microminerais tóxicos
Monovalentes:	Ferro	
Sódio	Zinco	
Potássio	Cobre	
Cloreto	Manganês	Alumínio
	Molibdênio	Arsênio
Bivalentes:	Cobalto	Cádmio
Cálcio	Selênio	Chumbo
Magnésio	Iodo	Mercúrio
	Fluoreto	
	Possivelmente essenciais(1):	
	Cromo	
	Níquel	
	Silício	
	Estanho	
	Vanádio	

Fonte: Jensen (1995)
(1) Aparentemente necessários na dieta de algumas espécies animais sob condições experimentais restritas, mas não são ainda considerados essenciais para os humanos.

Na análise de alimentos, o preparo da amostra é a etapa crítica podendo consumir até 95% do tempo total gasto com a análise (ALVARADO et al., 1988). Métodos tradicionais para o preparo de amostras de alimentos infantis são bem relatados na literatura e incluem digestão por via úmida ou por via seca (KIRA; MAIHARA, 2007), digestão assistida por micro-ondas (FUENTE et al., 1995; MINGORANCE et al., 1993; IKEM et al., 2002) e liofilização seguida de calcinação (CONI et al., 1996). Entretanto, esses métodos clássicos apresentam algumas desvantagens, tais como: maior possibilidade de perda de elementos voláteis e contaminações, maiores limites de detecção devido às diluições da amostra, consomem muito tempo e são, muitas vezes, dispendiosos (WIETESKA et al., 1996; MADER et al., 1998). Por outro lado, existem algumas alternativas, para o preparo de amostras que minimizam os inconvenientes da decomposição, como a introdução da amostra após solubilização, diluição ou uso de suspensão (CHMILENKO; BAKLANOV, 1999). A eficiência desses procedimentos frequentemente dependerá do tipo de

alimento, do analito e da técnica analítica empregada. Existe, portanto, a necessidade de desenvolver métodos rápidos e com exatidão e precisão elevados, nos quais as perdas e contaminações sejam minimizadas e seja possível a análise direta ou com poucas etapas de preparação.

1.2.1 Quantificação de constituintes inorgânicos em leite e similares por técnicas multielementares

As técnicas multielementares ICP OES e ICP-MS são muito utilizadas na avaliação da composição mineral de alimentos, pois permitem a rápida determinação de vários constituintes. A análise de alimentos por estas técnicas normalmente envolvem procedimentos de decomposição completa ou parcial das amostras previamente à etapa de determinação.

Diversos trabalhos envolvendo a determinação de macro e microelementos em leite e outros produtos lácteos por ICP OES são relatados (LANTE et al., 2006; IKEM et al., 2002; MCKINSTRY et al., 1999). Lante e colaboradores (2006) determinaram Ca, P, Na, Mg, K, S, Al, Fe, Zn e Se em amostras de leite e queijo por ICP OES, após decomposição em forno de micro-ondas com sistema fechado. Ikem e colaboradores (2002) determinaram Al, Ba, Be, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl e V por ICP OES em diversas formulações à base de leite e à base de soja, após digestão ácida em forno de micro-ondas com sistema fechado. McKinstry e colaboradores (1999) compararam a eficiência de diversos métodos de preparo de amostras de leite e fórmulas infantis para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn por ICP OES.

A técnica de ICP-MS também tem sido utilizada na determinação multielementar em amostras de leite e alimentos infantis similares, especialmente após digestão com agentes oxidantes (FRAZZOLI; BOCCA, 2008; ATARO et al., 2008; SANTOS et al., 2009). Frazzoli e Bocca (2008) determinaram As, Cd e Pb em leite bovino e fórmulas infantis empregando ICP-MS após digestão com HNO_3 e H_2O_2 em forno micro-ondas com sistema fechado. Ataro e colaboradores (2008) quantificaram

V, Cr, Mn, Sr, Cd e Pb em leite bovino cru usando ICP-MS após liofilização e digestão usando forno de micro-ondas. Em outro trabalho, trinta e duas amostras de leite produzido em Minas Gerais foram analisadas por ICP-MS após liofilização e decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas. Macro e micronutrientes foram determinados e a variação das concentrações destes constituintes nas amostras foi avaliada (SANTOS et al., 2009). A solubilização alcalina também tem sido utilizada no preparo de amostras para quantificação por ICP-MS. Nóbrega e colaboradores (1997) realizaram a análise de leite integral por ICP-MS, empregando a solubilização da amostra em uma solução de aminas-terciárias. As características mais atrativas da técnica são a capacidade multielementar e os baixos limites de detecção (LD´s), melhores que na técnica ICP OES. A maioria dos limites de detecção chegam 1 a 10 ng L^{-1} em soluções, podendo detectar muitos elementos que possuem LD´s inadequados em ICP OES. Esta característica é válida considerando que as amostras contenham não mais que 0,2% em volume de sólidos totais dissolvidos (WOLF, 2005; TYLER, 1994).

1.2.2 Quantificação de zinco em leite e similares por FAAS

Zinco é um elemento traço essencial para humanos, animais, plantas e micro-organismos. O corpo humano contém de 2 a 4 g de Zn (WELZ; SPERLING, 1999) o qual é integrante de muitas enzimas e essencial para a mobilização hepática da vitamina A. Sua concentração normal no sangue é de 130 μg dL^{-1} (FRANCO, 1992). Zinco é um elemento muito comum e pode ser encontrado no ar, solo, água e está naturalmente presente nos alimentos. Alimentos em contato com cobre galvanizado e embalagens plásticas podem apresentar maiores teores de Zn, por migração do metal da embalagem para o produto, aumentando a ingestão média do ser humano, que, segundo Azevedo e Chasin (2003), é da ordem de 0,14 a 0,21 mg Zn/kg/dia. A Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) registra que para diversos países a ingestão média diária de Zn varia de 5,2 a 16,2 mg (ATSDR, 1994). O Quadro 1.3 mostra a recomendação diária de ingestão de Zn em diversas faixas etárias (ANVISA, 2005).

Quadro 1.3 Ingestão Diária Recomendada (IDR) de zinco em função da faixa etária.

	Idade	IDR (mg dia^{-1})
Lactentes	0 a 6 meses	2,8
	7 a 11 meses	4,1
Crianças	1 a 3 anos	4,1
	4 a 6 anos	5,1
	7 a 10 anos	5,6
Adultos	-	7,0
Gestante		11
Lactante		9,5

Fonte: ANVISA, 2005.

Tanto a ausência como a exposição excessiva a esse elemento podem trazer efeitos nocivos. Sua deficiência está associada à diminuição no paladar, anorexia, apatia, retardo no crescimento, alopecia, hipogonadismo, hipospermia, retardamento da maturação sexual, intolerância a glicose e deficiência da imunidade (FRANCO, 1992). Uma dieta inadequada com deficiência de Zn associada a doenças hepáticas geradas por alcoolismo crônico pode causar dermatites, cegueira noturna, atrofia testicular, impotência, retardo na cicatrização de ferimentos, doença renal crônica e anemia miolítica. A deficiência de Zn no recém-nascido pode gerar dermatites, perda de cabelos, suscetibilidade a infecções e alterações neuropsicológicas (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Sua toxicidade pode ser aguda e crônica, sendo que exposições agudas podem causar náuseas, vômitos, dores abdominais e a toxicidade crônica leva à deficiência de cobre e anemia (FRANCO, 1992). Os níveis de Zn que produzem efeitos nocivos à saúde são muito maiores que os valores máximos recomendados para ingestão pela dieta (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

O excesso de zinco diminui a absorção de cobre. O mecanismo proposto para essa interação está baseado na observação de que o zinco em grandes quantidades leva ao aumento da síntese de uma proteína que tem afinidade em se ligar com o cobre, impedindo sua absorção. O zinco está presente em: carnes bovinas, peixe, aves, leite e

derivados, frutos do mar. O Quadro 1.4 apresenta a concentração média de Zn em diferentes grupos de alimentos. O conteúdo de fitato presente nos alimentos reduz a biodisponibilidade de Zn. A razão molar fitato:Zn de 20 já pode produzir efeito negativo, pois o fitato é carregado negativamente; logo, tem um grande potencial para ligar cátions bivalentes, tais como o zinco, impedindo assim sua absorção (MAFRA; COZZOLINO, 2004).

Quadro 1.4 Concentração média de Zn em vários grupos de alimentos.

Grupo de alimentos	Concentração média (mg kg^{-1})	Ingestão média (mg dia^{-1})
Derivados do leite	4,57	3,47
Carnes, peixes, aves	29,2	7,67
Grãos e cereais	8,68	3,64
Batatas	4,82	0,77
Vegetais verdes	2,26	0,12
Legumes	8,27	0,60

Fonte: ATSDR, 1994 apud AZEVEDO; CHASIN, 2003

O Zn é um elemento frequentemente determinado por FAAS. A concentração característica de 0,01 mg L^{-1} pode ser obtida em chama de ar-acetileno na linha de ressonância de 213,9 nm, sendo um dos elementos mais facilmente determinados em baixas concentrações por essa técnica. Altas concentrações de Zn podem ser determinadas na linha de ressonância de 307,6 nm com concentração característica de 50 mg L^{-1}. Cuidados são requeridos para se evitar contaminação das amostras na quantificação de Zn. O problema de contaminação naturalmente não se inicia durante a determinação, mas já começa durante a amostragem e preparo da amostra. O número de etapas preparatórias deve ser o menor possível (WELZ; SPERLING, 1999).

Silvestre e colaboradores (2000) otimizaram e validaram um método para determinação de Cu, Fe e Zn por FAAS em leite humano após mineralização das amostras por micro-ondas. Os autores obtiveram características analíticas adequadas e

concentrações de Zn de (8,60 ± 1,82) mg L^{-1} em colostro e concentrações entre 0,89 e 1,97 mg L^{-1} em leite maturado.

Bermejo e colaboradores (1997) utilizaram diferentes tipos de nebulizadores na determinação direta de Fe e Zn de amostras de leite (integral, desnatado e soro de leite) por FAAS. As características analíticas se mostraram adequadas e foram obtidas concentrações de Zn entre 2,73 e 7,99 mg L^{-1} para leite integral, 2,65 e 4,99 mg L^{-1} para desnatado e 0,36 e 0,82 mg L^{-1} para soro.

Nascentes e colaboradores (2004) otimizaram um método para determinação direta de Zn e Cu em sucos de frutas e leite bovino por espectrometria de absorção atômica com forno na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS), obtendo boa concordância para material certificado. Duas amostras de leite integral analisadas por esse método apresentaram concentração de (3,69 ± 0,03) mg L^{-1} e (3,92 ± 0,22) mg L^{-1} de Zn.

Fuentes e colaboradores (1995) avaliaram diferentes métodos de decomposição antes de determinarem Mn e Zn em leite por GFAAS e FAAS, respectivamente. Amostras comerciais de leite integral e desnatado foram analisadas após digestão por calcinação e por mineralização usando micro-ondas e as concentrações de Zn obtidas foram de (4,28 ± 0,17) mg kg^{-1} para leite desnatado e (3,60 ± 0,28) mg kg^{-1} para leite integral.

1.2.3 Quantificação de alumínio, cromo, manganês e molibdênio em leite e similares por GFAAS

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite tem se mostrado uma poderosa ferramenta para a determinação de elementos presentes em baixas concentrações em matrizes de importância biológica, não só por sua eficiência e sensibilidade (VANDECASTEELE, 1993), mas também pela possibilidade de remoção da matriz na etapa de pirólise, através do uso de modificadores químicos (VOLYNSKY, 2000; VOLYNSKII, 2003), o que permite a introdução da amostra

com o mínimo de preparo prévio desta. Para cada tipo de amostra, um programa de temperatura deve ser cuidadosamente otimizado pelo operador caso não haja um procedimento padronizado para o analito a ser determinado em uma dada matriz.

Os modificadores são substâncias ou elementos capazes de alterar as propriedades físico-químicas da matriz ou do analito presente em uma amostra, durante o processo de determinação com a finalidade de eliminar ou minimizar interferências. Quando é efetivo, o modificador torna os interferentes mais voláteis ou converte o analito em uma forma menos volátil, assegurando a separação completa da matriz e do analito (VOLYNSKY, 2000). Atualmente, os modificadores químicos são bastante utilizados na técnica de GFAAS. Segundo a IUPAC, o modificador químico tem como função estabilizar o analito termicamente, remover os concomitantes e/ou melhorar as condições de atomização (IUPAC, 1992).

Os modificadores químicos mais utilizados são o paládio (sozinho ou em uma mistura de nitrato de magnésio), o nitrato de magnésio e os compostos do grupo da platina (exceto ósmio) (VOLYSNKY, 2004). Em geral, estas substâncias são introduzidas no tubo de grafite junto com a amostra, previamente às etapas do programa de aquecimento, ou são depositadas termicamente dentro dos tubos de grafite, gerando uma superfície metálica, na qual a amostra é depositada posteriormente. Estes últimos são chamados de modificadores permanentes e podem ser utilizados isoladamente ou combinados. Os modificadores permanentes mais utilizados são os metais nobres de alto ponto de fusão como os do grupo da platina (Ir, Pd, Pt, Rh, Ru) (VOLYNSKY, 2000; VOLYSNKY, 2004) e os elementos formadores de carbetos (Mo, Re, Ti, Ta, V, Hf, B, Si, Zr, W, Nb) (VOLYNSKII, 2003; VOLYSNKY, 2004). A modificação permanente apresenta diversas vantagens, entre elas o aumento do tempo de vida útil do forno de grafite e a redução do tempo da análise.

1.2.3.1 Alumínio

Alumínio é o metal mais abundante da litosfera e é difundido nos vários segmentos do meio ambiente, sendo encontrado no solo, ar, água, plantas e consequentemente em toda a cadeia alimentar (BERTHOLF et al., 1988; GERHARDSSON, 1994). Este elemento é comumente usado na tecnologia de alimentos como componente de latas, folhas de Al, utensílios de cozinha e recipientes. O Al é também incluído em diferentes aditivos alimentícios (REILLY, 1980; CASARETT; DOULL, 1986). O Al é o 3º elemento mais abundante na crosta terrestre e é tóxico a concentrações relativamente baixas (WELZ; SPERLING, 1999). O Al encontrado normalmente no meio ambiente é provavelmente inofensivo para humanos saudáveis, mas para pacientes com problemas renais, uma absorção intestinal moderada de Al pode produzir efeitos tóxicos (WAWSCHINEK et al., 1982). Altas concentrações de Al são muitas vezes relacionadas à doença de Alzheimer (WELZ; SPERLING, 1999; LIN; HUANG, 2001) e a arteriosclerose (WELZ; SPERLING, 1999). Este elemento é reconhecidamente um agente neurotóxico. Apesar de os humanos possuírem naturalmente barreiras com alta eficiência para limitar as concentrações de Al no sistema nervoso central, sob condições específicas, estas barreiras não podem desempenhar sua função com tanta eficiência, como, por exemplo, no caso de pacientes portadores de insuficiência renal submetidos a tratamento prolongado. Estes pacientes desenvolvem sintomas de intoxicação por Al, através de exposição durante semanas ou meses ao fluido da diálise ou das soluções parenterais utilizadas durante a terapia, os quais contêm Al. Existem relatos de desenvolvimento de anemia microcítica, encefalopatia e osteomalácia (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Embora várias formas de exposições ao Al sejam conhecidas, a dieta é a fonte mais importante (PENNINGTON; JONES, 1989; MASSEY; TAYLOR, 1991). Os maiores contribuintes na dieta são grãos (24-49%), produtos lácteos (17-36%), sobremesas (9-26%) e bebidas (5-10%) (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Estudos realizados sobre exposição humana ao Al por meio da dieta e ambiente em uma ampla variedade de locais geográficos mostraram a ingestão de Al na dieta variando de 1 a

100 mg, e a média diária de ingestão seria de 10-12 mg (BERTHOLF et al., 1988). Estudos publicados mostram que a biodisponibilidade relativa deste elemento varia extensivamente de acordo com a forma de ingestão por meio da dieta (ARRUDA et al., 1995).

A determinação de Al em níveis traço em materiais biológicos não é fácil, pois a maioria dos métodos aplicáveis a outros metais apresenta problemas de contaminação quando aplicado ao Al em níveis de mg L^{-1}, mg kg^{-1} ou abaixo (MOTKOSKY; KRATOCHVIL, 1993). O grande problema na determinação do Al é sem dúvida a sua ubiquidade, que resulta em risco de contaminação e causa repetitividade inadequada e altos valores de brancos (WELZ; SPERLING, 1999). Todavia, Arruda e colaboradores (ARRUDA et al., 1994) desenvolveram um método sensível e preciso para determinação direta de Al em leite por GFAAS, sem pré-tratamento da amostra, usando $MgNO_3$ como modificador químico. Dabeka e Mckenzie (1992) também utilizaram um método para determinação de Al e outros metais em formulas infantis por GFAAS, porém trataram a amostra previamente através de digestão ácida e empregaram Pd como modificador químico. Uma decomposição ácida também foi empregada em sistema fechado na determinação de Al e outros elementos em leite integral e produtos lácteos por ICP OES (AYAR et al., 2009). A decomposição em sistema aberto por via seca e via úmida também foram utilizadas em comparação com a decomposição por micro-ondas em sistema fechado, na determinação de Al e outros metais por GFAAS, sendo que a última opção apresentou melhores resultados de exatidão (SARACOGLU et al., 2007).

1.2.3.2 Cromo

Segundo Franco, o teor de Cr nos tecidos é de 0,02 a 0,04 mg no homem adulto (FRANCO, 1992) e a quantidade total no corpo humano varia entre 0,4 e 6 mg, sendo encontrados níveis mais altos em crianças (FRANCO, 1992; PECHOVA; PAVLATA, 2007). O Cr^{3+} é um elemento traço essencial e possui um importante papel no metabolismo da glicose (WELZ; SPERLING, 1999). É um cofator na ação da insulina

e tem um papel nas atividades periféricas deste hormônio (AZEVEDO; CHASIN, 2003). O cromo é importante no metabolismo dos lipídios e ácidos nucleicos, mantendo a integridade estrutural nuclear e regulando a expressão do gene (FRANCO, 1992). Por outro lado, os compostos de Cr^{6+} são tóxicos para os seres humanos (WELZ; SPERLING, 1999).

Os compostos de Cr^{6+} podem provocar efeitos nocivos na pele, no trato respiratório e, em menor extensão, nos rins. O Cr^{3+} é menos tóxico (AZEVEDO; CHASIN, 2003; PECHOVA; PAVLATA, 2007). A toxidez do Cr^{3+} é de fato menor que a toxicidade de todos os outros elementos essenciais como Cu, I, Zn, Mn e especialmente Se (PECHOVA; PAVLATA, 2007).

O cromo pode se apresentar na dieta na forma de compostos inorgânicos ou de complexos orgânicos (PECHOVA; PAVLATA, 2007). Na maioria dos alimentos, o cromo existe em baixa concentração. Entre os alimentos mais ricos estão o peixe, a lagosta, o frango e o levedo de cerveja. Alimentos ácidos, que ficam em contato com superfícies de aço inoxidável durante a colheita, processamento e armazenamento, podem apresentar, algumas vezes, concentrações mais altas de cromo devido à lixiviação (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

A carência de Cr nos seres humanos pode ocorrer em crianças que sofram de má nutrição proteino-calórica e em pessoas mais velhas com menor tolerância à glicose. Estes fatos, entretanto, não são bem documentados. Sintomas de deficiência do metal baseiam-se em poucos casos relatados. Neuropatia periférica, perda de peso e disfunção do metabolismo da glicose foram descritos (AZEVEDO; CHASIN, 2003), além de redução do quociente respiratório e hiperglicemia no jejum (FRANCO, 1992).

Para elementos essenciais como o Cr há riscos associados ao ingresso corpóreo, tanto de baixas como de elevadas concentrações do metal. A faixa de concentração que preenche os requisitos biológicos e previne a toxicidade pode ser estreita. Assim, na avaliação do risco, esses dois aspectos – essencialidade e toxicidade – devem ser considerados (AZEVEDO; CHASIN, 2003). A ingestão diária recomendada (IDR) em função da faixa etária pode ser visualizada no Quadro 1.5.

Quadro1.5 Ingestão diária recomendada (IDR)em função da faixa etária.

	Faixa etária	IDR (µg dia^{-1})
Lactentes	0 a 6 meses 7 a 11 meses	0,2 5,5
Crianças	1 – 3 4-6 7-10	11 15 15
Adultos		35
Gestantes		30
Lactantes		45

Fonte: ANVISA, 2005

A determinação de Cr em alimentos infantis é relatada por vários autores. A técnica GFAAS é uma opção adequada, oferecendo várias vantagens, visto que possui sensibilidade requerida para a determinação em níveis de traço e possui a possibilidade de análise direta. Sola-Larrañaga e Navarro-Blaso usando correção de fundo por Zeeman e THGA[5] na técnica GFAAS, determinaram o conteúdo de Cr em 104 fórmulas infantis à base de leite de vaca e de proteína de soja comercializadas na Espanha, porém, após digestão acida em sistema fechado por micro-ondas. Em geral, os autores encontraram para a fórmula infantil um conteúdo de Cr maior que em leite humano (SOLA-LARRAÑAGA; NAVARRO-BLASCO, 2006). Quinaia e Nóbrega desenvolveram um método para determinação direta de Cr em leite usando GFAAS com correção de fundo por Zeeman e uma mistura de aminas como diluente. A calibração foi efetuada pelo método de adição padrão, encontrando-se valores entre 0,98 e 18,1 ng g^{-1} para amostras de leite integral acondicionados em diversos tipos de embalagens (QUINAIA; NOBREGA, 2000).

1.2.3.3 Manganês

O Mn é um elemento traço essencial que está presente em todas as células vivas. O corpo humano, em condições normais, contém cerca de 20 mg de Mn (OGA, 1996; WELZ; SPERLING, 1999, LIDE, 2006) o qual está presente em diversas oxidoredutases e outras enzimas exercendo várias funções biológicas. A vida fetal e a

[5] *Transversely Heated Graphite Atomizer* – atomizador de grafite aquecido transversalmente.

primeira infância são os períodos mais vulneráveis à deficiência do Mn (JENSEN, 1995), embora rara. A deficiência pode causar dermatite, problemas no metabolismo de glicose e proteico, anormalidades nas mitocôndrias, infertilidade, má formação dos ossos, diminuição do colesterol sérico e outros (ATSDR, 2000). Apesar da absorção via ingestão de Mn ser de apenas 3 a 5%, os alimentos, além de constituírem a maior fonte de Mn para a população em geral, são também a fonte primária do mineral absorvido (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

A ingestão diária recomendada para faixa etária de até 6 meses é 3 μg dia^{-1}; de 6 meses a 1 ano 0,6 mg dia^{-1}; entre 1 e 3 anos 1,2 mg dia^{-1}; entre 4 e 10 anos 1,5 mg dia^{-1} e acima de 10 anos 2,3 mg dia^{-1}. (ANVISA 2005).

Apesar da essencialidade, em excesso pode ser tóxico e o sistema nervoso parece ser o mais vulnerável (ERIKSON et al., 2007). A neurotoxicidade do Mn em adultos é associada com sintomas de Parkinson enquanto seus efeitos em crianças não são bem caracterizados. Bebês e crianças são bastante sensíveis à toxicidade do Mn. Neonatos acumulam mais Mn do que adultos devido à maior absorção do elemento (GARCIA, 2007). Segundo Azevedo e Chasin (2003) os níveis encontrados em leite e derivados variam de 0,02 a 0,49 μg g^{-1}. Jensen (1995) relata que a concentração de Mn em leite humano varia de 3 a 6 μg L^{-1} e de 5 a 12 μg L^{-1} no colostro. No leite bovino, o Mn encontra-se em concentrações de cerca de 21 μg L^{-1}. Leite humano em geral possui concentrações menores enquanto o conteúdo das fórmulas infantis pode variar drasticamente (ERIKSON et al., 2007). Já o alimento de soja merece atenção especial. As plantas absorvem Mn na forma de íon bivalente (CARDOSO et al., 2003; MASCARENHAS et al., 2004) e a soja pode concentrá-lo em seus grãos. Uma mamadeira de alimento de soja pode conter um teor de Mn muitas vezes maior do que aquele encontrado no leite materno. Assim, a informação sobre os níveis desse metal em leites e alimentos infantis similares é de extrema importância, levando-se em consideração os riscos a saúde humana. A quantificação deve, portanto, ser realizada por técnicas mais sensíveis como a GFAAS ou outras técnicas espectroanalíticas multielementares, devido às baixas concentrações geralmente encontradas em leite bovino e humano. Casey e colaboradores determinaram Zn, Cu Mn e Cr em 259

amostras de leite humano por GFAAS, encontrando valores entre 2,7 e 5,4 ng mL^{-1} para Mn, pelo método das adições de analito, usando 50 μL de amostra adicionados a 200 μL de HNO_3 30 mmol L^{-1} (1985). Al-Awadi e Srikumar (2000) realizaram o preparo de 13 amostras de leite humano usando digestão ácida em uma mistura de ácido nítrico e perclórico, encontrando uma média de 4,0 μg L^{-1} de Mn, pela técnica de GFAAS.

1.2.3.4 Molibdênio

O molibdênio, Mo, é um metal de transição refratário e considerado um elemento-traço essencial. A forma biologicamente ativa é como cofator presente em pelo menos quatro enzimas humanas e cuja deficiência pode produzir desordens neurológicas (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2007). Este cofator encontra-se em organismos animais, principalmente como a metaloenzima xantino-oxidase e nas enzimas aldeído-oxidase e sulfito-oxidase, em plantas. Este elemento é necessário para a fixação de nitrogênio atmosférico através de bactérias no início da síntese proteica (HOLZINGER et al. 1998; PYRZYNSKA, 2007). O metabolismo de Mo é intimamente associado ao do cobre. Embora este elemento seja essencial à ação de certas enzimas, níveis mais altos podem inibir a ação destas enzimas. Altos níveis de Mo na dieta têm sido associados a níveis elevados de ácido úrico no sangue e a uma doença que se assemelham a gota (NIOSH/OSHA 1978). O estado químico do elemento, a rota de exposição, e fatores de composição como cobre na dieta e níveis de enxofre podem afetar a toxicidade. Casos moderados de molibdenose podem ser clinicamente identificáveis somente através de mudanças bioquímicas, como por exemplo, aumento nos níveis ácido úrico devido ao papel do Mo na enzima xantino-oxidase. Entrada excessiva de Mo causa deficiência fisiológica de cobre, e reciprocamente, em casos de entrada inadequada de cobre na dieta, toxicidade de molibdênio pode acontecer em níveis mais baixos de exposição (NRC, 1989).

A concentração total de Mo no sangue e plasma se encontram na faixa de 0,33 a 7,20 μg L^{-1} e de 0,19 a 1,16 μg L^{-1}, respectivamente (FRANCO, 1992). A entrada diária recomendada é 2 μg para crianças de 0 a 6 meses, 3 μg para crianças entre 7 e

12 meses, 17 μg para crianças de 1a 3 anos e 22 μg para crianças entre 4 e 10 anos. Para adultos a ingestão diária recomendada é de 45 μg (ANVISA, 2005).

Devido ao comportamento tóxico e essencial, é de grande importância determinar Mo em amostras de alimentos. As fontes deste elemento para bebês são os leites materno e bovino, as bebidas de soja e as fórmulas infantis. De acordo com Jensen (1995), o leite bovino contém de 12 a 22 μg L^{-1} de Mo enquanto o leite humano contém 1 a 2 μg L^{-1} e o colostro possui de 10 a 20 μg L^{-1}. Baixos níveis de Mo em leite e alimentos infantis necessitam de método analíticos com boa exatidão e adequada sensibilidade.

A GFAAS e as técnicas com plasma (ICP OES e ICP-MS) têm sido amplamente empregadas para determinação total de Mo em vários tipos de amostras de alimentos (REID et al. 2008; YOSHIDA et al. 2008; LÓPEZ-GARCÍA et al. 2007). A maioria das técnicas analíticas para determinação de metais requer um método de preparo das amostras que promova a solubilização da amostra com completa ou parcial decomposição da matriz, seja usando substâncias alcalinas, ácidas e/ou agentes oxidantes.

Várias estratégias para determinação direta, com ou sem preparação da amostra, têm sido frequentemente estudadas para minimizar o tempo da análise, o custo, contaminação e perda do analito, bem como para melhorar os limites de detecção e a sensibilidade dos métodos. Cava-Montesinos e colaboradores (2005) propuseram um método rápido para determinação de 45 elementos, incluindo Mo, em leite por ICP-MS usando extração ácida assistida por ultrassom à temperatura ambiente. Burguera e colaboradores (2002) determinaram Mo em amostras biológicas usando um método apropriado e eficiente empregando GFAAS após diluição com solução de Triton X-100. Neste trabalho encontraram concentrações na faixa de 13,1 a 16,9 μg L^{-1} com uso de 25,0 μg de érbio como modificador. Molibdênio também foi determinado em amostras de leite em pó usando suspensões preparadas a 10% (m/v) em um meio contendo 25 e 75% (v/v) de H_2O_2 concentrado e HF, respectivamente, e introduzido diretamente no forno de grafite. Paládio (200 μg mL^{-1}) foi usado como modificador e a

calibração realizada com padrões preparados no mesmo meio (López-García et al. 2007).

1.3. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

As condições operacionais ótimas para se realizar medidas em GFAAS de um determinado analito em uma dada matriz nem sempre estão pré-estabelecidas, em virtude dos inúmeros tipos de amostras e de dificuldades particulares na determinação de alguns elementos. Determinar as condições operacionais ótimas é uma tarefa trabalhosa e demorada, que depende de muito estudo sobre o elemento e a natureza da matriz da amostra (GARREC et al., 1998).

Existem diversas maneiras de se otimizar as condições de um experimento. Duas delas foram utilizadas neste trabalho: o método univariado, também chamado de clássico ou convencional e o método multivariado, utilizando-se planejamentos fatoriais.

O método univariado envolve a alteração sistemática de apenas uma variável enquanto as outras variáveis permanecem constantes. A variável é modificada até que se encontre a melhor resposta, passando, então a uma condição fixa enquanto outra variável sofre o mesmo processo. Esse processo é provavelmente o mais comum em química, mas não garante a localização das condições ótimas, principalmente quando se trata de sistemas onde as variáveis apresentem interações sinérgicas ou antagônicas. Neste caso o método univariado pode falhar e um falso ótimo poderá ser encontrado (NETO et al., 1996). Embora muitas conclusões possam ser retiradas de aproximações univariadas, através deste método não se obtêm a informação sobre a interdependência entre as variáveis, fatores muito importantes sob a perspectiva de desenvolvimento e validação de métodos (MOREDA-PIÑERO et al., 2001).

No método multivariado, todas as variáveis são estudadas ao mesmo tempo, o que permite a avaliação das interações entre as mesmas, minimizando o risco de estabelecer condições ótimas falsas. Esse método é bastante rápido, econômico e efetivo, pois minimiza o número de experimentos quando comparado ao método

clássico. Esta otimização pode ser realizada usando um ou mais planejamentos experimentais apropriados. Em química, o planejamento experimental tem sido amplamente utilizado em diversas situações (CASTRO; BACCAN, 2005). No caso de determinações de condições ótimas em GFAAS, este estudo é bastante atrativo, pois variáveis como volume de injeção da amostra, temperatura de injeção, temperatura de pirólise e de atomização, tempo de pirólise, tempo de rampa, tipo e quantidade de modificador tornam o trabalho de otimização muito oneroso e demorado. Através de um planejamento experimental pode-se realizar menor número de experimentos de forma segura, tornando o processo de otimização mais rápido, econômico e limpo. Rebouças e colaboradores (REBOUÇAS et al., 2005) fizeram um trabalho detalhado sobre o comportamento de modificadores químicos na determinação de As em produtos de petróleo usando otimização através de um planejamento Doehlert. Em outro trabalho, um método para determinar As por ETAAS em fluxos de refinaria de petróleo foi otimizado por meio de um planejamento Doehlert (CASSELA et al., 2002) e Garrec e colaboradores (GARREC et al., 1998) utilizaram um planejamento fatorial de dois níveis para determinar as condições ótimas para se determinar Cd, Mn e Cu em água do mar por ETAAS.

Através do planejamento fatorial é possível reduzir o número de experimentos e desenvolver métodos eficazes em GFAAS. Três tipos de planejamentos experimentais foram realizados neste trabalho: planejamento fatorial fracionário, planejamento Doehlert e planejamento composto central**.**

1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O valor das medições químicas depende do nível de confiança que pode ser colocada nos resultados (EURACHEM, 2002). Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação. A validação do método é um conjunto de medidas que um laboratório deve implementar e que lhe permitirá produzir dados analíticos confiáveis (THOMPSON et al., 2002).

Para a validação de métodos que empregam a técnica GFAAS e FAAS, os parâmetros de mérito mais comumente avaliados são seletividade, linearidade, massa característica (para GFAAS), limite de detecção e de quantificação, precisão e exatidão (avaliada pela determinação do analito em materiais certificados ou pela recuperação do analito em amostras fortificadas).

Neste trabalho, a massa característica (determinada em GFAAS) foi determinada a partir de medidas de absorvância de uma massa conhecida do analito de acordo com a equação seguinte (BEATY; KERBER, 1993):

$$m_0\,(pg) = \frac{\text{vol. de amostra } (\mu L) \,.\, \text{conc. analito } (\mu g\, L^{-1}) \,.\, 0{,}0044\, s}{\text{área do pico } (s)} \qquad \text{(equação 1)}$$

Os demais parâmetros foram determinados utilizando-se metodologias definidas pela ANVISA, INMETRO e IUPAC (ANVISA, 2003b; INMETRO, 2010; THOMSEN et al., 2003), incluindo-se as equações 2 e 3:

$$LD = 3.\, s_{branco,\, n=10} / S \qquad \text{(equação 2)}$$

$$LQ = 10 \,.\, s_{branco,\, n=10} / S \qquad \text{(equação 3)}$$

S é a inclinação da curva de calibração e $s_{branco,\ n=10}$ é o desvio padrão das concentrações de dez brancos analíticos determinados pela mesma curva de calibração.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

- Avaliar o conteúdo de Ca, Na, Mg, Al, K, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Sb, Ba e Pb em amostras de leites e outros alimentos infantis a base de leite e soja empregando a técnica ICP-MS e FAAS.

- Desenvolver um método de análise direta empregando a técnica FAAS para a determinação de Zn nas amostras acima referidas.

- Desenvolver métodos para determinação direta de Al, Cr, Mn e Mo em amostras de leites e outros alimentos infantis a base de leite e soja, empregando a técnica GFAAS e a otimização multivariada para estabelecer as condições experimentais.

CAPÍTULO III. DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES POR ICP-MS

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta etapa do trabalho, a determinação dos constituintes inorgânicos utilizando ICP-MS foi realizada no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN), Serviço de Reator e Radioanálise. Esta técnica foi utilizada para uma avaliação preliminar das amostras, com a finalidade de se obter uma impressão geral de cada matriz estudada, em termos de íons metálicos presentes.

3.1.1 Instrumentação

As determinações dos macroelementos (Na, K, Mg) e elementos traço (V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Sb, Ba e Pb) nas amostras de leite e similares foram realizadas usando um espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), modelo ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Shelton, USA). O sistema de introdução da amostra é composto de um amostrador automático AS 90 Plus (Perkin Elmer, Shelton, USA) e um nebulizador do tipo Meinhardt, com câmara ciclônica de quartzo. Os parâmetros operacionais do equipamento utilizados e o número de massa dos isótopos monitorados estão mostrados na Tabela 3.1.

O forno de micro-ondas com cavidade modelo Ethos (Milestone, Sorisole, Itália), com controle de temperatura e pressão internas e frascos reacionais em PFA[1] de 100 mL, foi utilizado para a decomposição das amostras.

[1] Polifluor alcoxi.

Tabela 3.1 Parâmetros operacionais empregados na determinação de elementos em leite em pó e alimentos infantis similares por ICP-MS.

Parâmetro	Valor ou especificação
Potência aplicada (W)	1400
Vazão de Argônio no nebulizador (L min^{-1})	0,84
Vazão da amostra (mL min^{-1})	1,0
Medidas	3 x 20 *scans*
Modo detector	Dual
Cones (amostra/*skimmer*)	Níquel
Voltagem da lente	6,5 V
Dwell Time	50 ms
Isótopos	^{23}Na, ^{24}Mg, ^{27}Al, ^{39}K, ^{51}V, ^{53}Cr, ^{55}Mn, ^{59}Co, ^{60}Ni, ^{63}Cu, ^{66}Zn, ^{75}As, ^{85}Rb, ^{86}Sr, ^{98}Mo, ^{114}Cd, ^{121}Sb, ^{135}Ba, ^{208}Pb
Padrões Internos (20 μg L^{-1})	Ho, Ge, Sc, In

3.1.2 Reagentes e materiais certificados

A água purificada com baixa resistividade (< 18,2 MΩ cm) utilizada no preparo das soluções e das amostras foi obtida em um sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA). Foram utilizados os seguintes reagentes e materiais de referência:

- Ácido nítrico 65% em massa, sub-destilado. A purificação do HNO_3 foi realizada em um destilador de ácidos modelo SubPur (Milestone, Sorisole, Itália).
- Peróxido de hidrogênio 30% em massa (Merck, Darmstad, Alemanha);
- Solução de referência multielementar de 100 μg mL^{-1} de As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V e Zn (Perkin Elmer, Shelton, USA);
- Solução de referência de 10 000 μg mL^{-1} de Ge (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Soluções de referência de 1000 μg mL^{-1} de Al, Ba e In (Fluka, Buchs, Suíça);
- Soluções de referência de 1000 μg mL^{-1} de Rb, Sc e Ho (Perkin Elmer, Shelton, USA).

- Leite desnatado em pó, SRM[2] 1549 - *non-fat milk powder* (NIST[3], Gaithersburg, USA);
- Leite integral em pó, SRM 8435 - *whole milk powder* (NIST, Gaithersburg, USA);
- Fórmula infantil, SRM 1846 - *infant formula* (NIST, Gaithersburg, USA);
- Leite integral em pó, SRM 153 - *milk powder* (IAEA[4], Vienna, Áustria)

Todas as soluções utilizadas foram preparadas diariamente através de diluição adequada das soluções de referência.

3.1.3 Amostras

Amostras de leite, fórmulas infantis, bebidas lácteas, alimentos de soja e leite de cabra, todas em pó, foram adquiridas no comércio de Belo Horizonte. Estas amostras foram codificadas e classificadas em grupos para melhor avaliação dos resultados (Tabela 3.2).

[2] Material de referência, do original *"Standard Reference Material"*.
[3] Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do original *"National Institute of Standards Technology"*.
[4] Agência Internacional de Energia Atômica, do original "International Atomic Energy Agency".

Tabela 3.2 Amostras em pó de leite e outros alimentos infantis similares analisadas e codificação utilizada.

Cód.	Descrição	Cód.	Descrição
I1	Leite integral	**F2**	Fórmula infantil com ferro para lactentes com proteínas lácteas
I2	Leite integral	**F3**	Fórmula infantil
I3	Leite integral	**F4**	Fórmula infantil
I4	Leite Integral	**F5**	Fórmula infantil
I5	Leite integral	**F6**	Fórmula infantil
I6	Leite integral	**F7**	Fórmula infantil
IE1	Leite integral enriquecido com vitaminas A e D	**F8**	Fórmula infantil
M1	Bebida láctea	**S1**	Alimento com soja rico em vitaminas e minerais
M2	Bebida láctea	**S2**	Alimento com soja
M2	Bebida láctea	**S3**	Alimento com soja
D1	Leite desnatado	**FS1**	Fórmula infantil com soja
D2	Leite desnatado	**FS2**	Fórmula infantil com soja
DE1	Leite semi-desnatado rico em cálcio, vitaminas e fonte de minerais	**C1**	Leite integral de cabra
DE2	Leite semi-desnatado enriquecido com vitaminas e minerais	**C2**	Leite integral de cabra
F1	Fórmula infantil de seguimento com ferro para lactentes		

3.1.4 Decomposição assistida por radiação micro-ondas

A decomposição das amostras e dos materiais de referência certificados foi realizada adicionando-se 3,0 mL de ácido nítrico sub-destilado, 1,00 mL de peróxido de hidrogênio a 30% em massa e 3,00 mL de água deionizada a 0,2000 g das amostras em pó, que foram pesadas diretamente nos frascos reacionais de PFA. Os frascos

foram então fechados e submetidos ao programa de aquecimento apresentado na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Programa de aquecimento utilizado para decomposição assistida por micro-ondas das amostras de leite e alimentos infantis similares.

Etapa	Temperatura (ºC)	Tempo (minutos)
1	80	5
2	80	1
3	120	5
4	150	5
5	180	4
6	180	3
7	Ventilação	30

Após decomposição e resfriamento, os frascos foram abertos e as soluções dos digeridos foram transferidas quantitativamente para frascos de polipropileno de 50,00 mL graduados, sendo o volume final aferido para 25,00 mL com água deionizada. As soluções resultantes apresentaram-se límpidas, mostrando uma digestão adequada.

3.2.5 Análise por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A faixa de concentração das curvas de calibração foram de 0 a 100 μg L^{-1} para os elementos Al, K, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Sb, Ba e Pb de 0 a 2000 μg L^{-1} para Na e Mg, sendo as soluções preparadas a partir das soluções de referência em meio ácido (HNO_3 1% v/v) e usando padrões internos (Sc, Ge, In e Ho, 20 μg L^{-1}). Após a construção das curvas de calibração, as amostras digeridas em sistema de micro-ondas foram diluídas adequadamente em meio ácido (HNO_3 1% v/v) e analisadas nas condições operacionais descritas na Tabela 3.1.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Desempenho analítico do ICP-MS

Para se avaliar o desempenho analítico do ICP-MS, calculou-se as equações lineares, os coeficientes de correlação (*r*) e o limites de detecção para cada um dos analitos, que podem ser observados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Equações de regressão linear, coeficientes de correlação linear (r) e limites de detecção obtidos para as curvas de calibração do ICP-MS.

Elemento	Equação da regressão linear[a]	*r*	Limites de detecção[b] ($\mu g\ kg^{-1}$)
Na	$y = 0{,}0441\ x + 4{,}1648$	0,9949	0,56
Mg	$y = 0{,}0022\ x + 0{,}0299$	0,9997	0,56
Al	$y = 0{,}1255\ x + 0{,}2656$	0,9974	9,3
K	$y = 1{,}4599\ x + 1{,}8353$	0,9980	0,37
V	$y = 0{,}2631\ x + 0{,}0800$	0,9999	0,93
Cr	$y = 0{,}0284\ x - 0{,}0001$	1,0000	0,37
Mn	$y = 0{,}2659\ x + 1{,}1520$	0,9815	0,13
Co	$y = 0{,}2978\ x + 0{,}0006$	0,9999	1,7
Ni	$y = 0{,}0645\ x - 0{,}0070$	0,9999	0,74
Cu	$y = 0{,}1343\ x + 0{,}0277$	1,0000	0,37
Zn	$y = 0{,}0497\ x - 0{,}0021$	0,9999	0,56
As	$y = 0{,}0525\ x + 0{,}0006$	1,0000	1,1
Rb	$y = 0{,}2666\ x - 0{,}0483$	0,9999	0,74
Sr	$y = 0{,}0407\ x - 0{,}0082$	0,9999	0,037
Mo	$y = 0{,}0788\ x - 0{,}0259$	0,9998	1,9
Cd	$y = 0{,}0776\ x - 0{,}0062$	0,9999	0,17
Sb	$y = 0{,}1110\ x - 0{,}0338$	0,9998	1,7
Ba	$y = 0{,}0261\ x - 0{,}0198$	0,9998	0,037
Pb	$y = 0{,}288375\ x - 0{,}002558$	0,9999	0,074

[a] Faixa linear de calibração de 0 a 2000 $\mu g\ L^{-1}$ para Na e Mg e de 0 a 100 $\mu g\ L^{-1}$ para os demais elementos.
[b] Calculado pelo critério IUPAC.

As curvas de calibração apresentaram-se lineares na faixa de concentrações utilizadas neste trabalho, obtendo-se coeficientes de correlação (*r)* próximos ou iguais a 1,0000. Os limites de detecção variaram de 0,037 a 9,3 $\mu g\ kg^{-1}$.

Para se avaliar a exatidão do método, materiais de referência certificados foram analisados de acordo com o descrito anteriormente e os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.5. A precisão, expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR) foi calculada em função dos resultados obtidos para os materiais certificados.

Tabela 3.5 Resultados de determinação dos metais em materiais de referência certificados por ICP-MS (n=3).

Analito	Valor médio obtido ± desvio padrão, mg kg^{-1}	Valor certificado[a], mg kg^{-1}	Exatidão, %	DPR, %
Fórmula infantil (NIST, *infant formula*, SRM 1846)				
Na	2411 ± 101	2310 ± 130	104	4,2
Mg	513 ± 11	538 ± 29	95	2,3
K	7232 ± 176	7160 ± 380	101	2,4
Cu	5,4 ± 1,2	5,04 ± 0,27	107	3,2
Zn	58,1 ± 2,3	60 ± 3,2	96	4,0
Leite desnatado em pó (NIST, *non-fat milk powder*, SRM 1549)				
Na	4187 ± 158	4970 ± 100	84	4
Mg	1082 ± 50	1200 ± 30	90	5
K	16727 ± 26	16900 ± 300	99	0,2
Cu	0,726 ± 0,046	0,7 ± 0,1	105	1,2
Zn	51,55 ± 0,99	46,1 ± 2,2	112	1,9
Leite integral em pó (NIST, *whole milk powder*, SRM 8435)				
Na	3346 ± 139	3560 ± 400	94	4,2
Mg	805 ± 46	814 ± 76	99	5,9
K	12304 ± 475	13630 ± 470	90	3,9
Al	1,02 ± 0,23	(0,9)	114	22
Cr	0,53 ± 0,07	(0,50)	106	13,2
Mn	0,21 ± 0,03	0,17 ± 0,05	122	17
Zn	27,14 ± 6,59	28,00 ± 3,10	97	24,3
Cu	0,53 ± 0,04	0,46 ± 0,08	114	7,8
Rb	15,08 ± 0,69	(16)	83	5,2
Sr	4,63 ± 1,54	4,35 ± 0,50	106	33,2

[a] Os valores entre parênteses se referem a valores informativos.

Analisando os resultados, pode-se verificar que o método apresentou exatidão satisfatória (exatidão entre 83 a 122%) para os elementos mostrados na Tabela 3.5. Testes estatísticos mostraram que as médias são estatisticamente iguais para os analitos Na, Mg, K, Cu, Zn, Cr, Mn e Sr (limite de confiança de 95%, testes *t* e *f*). Para os analitos Cd, Pb, Sb, Co, Ba e Ni, os limites de detecção obtidos não foram adequados para as concentrações encontradas nestes materiais de referência. Na

determinação de Ca foi utilizada a técnica FAAS devido a problemas na exatidão em ICP-MS. Com relação à precisão, o DPR variou de 0,2 a 33,2%, sendo os piores resultados obtidos para o leite integral e para os analitos que se encontram em menores concentrações. Ainda que a precisão não tenha apresentado resultado satisfatório para todos os elementos, o método foi utilizado com a finalidade de se obter uma avaliação global das amostras.

3.3.2 Análise das amostras de leite e alimentos similares

Os resultados obtidos na análise das amostras digeridas foram compilados em faixas de concentração para cada tipo de amostra e podem ser visualizados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Resultados obtidos na quantificação de constituintes inorgânicos em alimentos infantis por ICP-MS. (continua)

Tipo de amostras	n		Faixa de concentração, mg kg^{-1}										
			Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	Sb	Ba	Pb
Leite integral	7	Mín.	<LD	<LD	26,4	<LD	21,3	3,96	<LD	<LD	<LD	0,70	<LD
		Max.	0,67	1,55	96,8	<LD	51,4	5,82	0,86	0,13	0,61	1,71	0,10
		Média	0,26	0,75	52,7	-	37,6	5,23	0,24	0,04	0,16	1,36	0,02
		%DPR	103	79,7	48,9	-	11,9	14,9	171	172	171	25,6	189
Bebida láctea	3	Mín.	<LD	0,67	16,4	<LD	16,1	0,75	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Max.	0,67	1,08	59,2	<LD	27,8	54,5	<LD	<LD	<LD	1,84	<LD
		Média	0,22	0,86	33,9	-	22,9	19,2	-	-	-	0,69	-
		%DPR	173	24,1	66,2	-	26,5	160	-	-	-	146	-
Leite desnatado	2	Mín.	<LD	<LD	40,9	<LD	54,5	8,58	<LD	<LD	<LD	2,90	<LD
		Max.	<LD	0,11	42,0	<LD	78,8	11,2	<LD	<LD	<LD	3,87	<LD
		Média	-	0,05	41,4	-	66,6	9,88	-	-	-	3,39	-
		%DPR	-	141	1,83	-	25,8	18,6	-	-	-	20,3	-
Fórmula infantil e enriquecidos	10	Mín.	<LD	<LD	32,9	<LD	1,19	2,20	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Max.	0,53	12,7	252	<LD	24,4	24,9	0,76	0,15	0,58	5,3	<LD
		Média	0,17	3,82	69,4	-	10,4	7,99	0,19	0,05	0,17	1,71	-
		%DPR	132	111	93,9	-	77,9	96,5	140	132	135	94,9	-
Alimento com Soja	5	Mín.	<LD	2,78	22,0	<LD	<LD	1,19	0,06	<LD	<LD	1,84	<LD
		Max.	0,64	11,1	133	0,28	8,05	6,34	3,56	0,16	0,64	4,73	<LD
		Média	0,39	6,13	83,2	0,10	3,27	3,94	1,32	0,03	0,13	3,05	-
		%DPR	60,9	56,0	49,5	139	125	51,0	104	223	218	35,6	-
Leite de Cabra	2	Mín.	<LD	0,32	56,8	0,22	64,2	6,83	0,39	<LD	<LD	1,01	<LD
		Max.	<LD	0,56	78,9	0,23	66,3	7,63	0,45	<LD	<LD	3,00	<LD
		Média	-	0,44	67,8	0,22	65,3	7,23	0,42	-	-	2,0	-
		%DPR	-	38,7	23,1	1,33	2,24	7,83	10,6	-	-	70,0	-

(conclusão)

Tipo de amostras	n		Faixa de concentração, mg kg^{-1}								
			Na	Mg	Al	K	Ca*	V	Cr	Mn	Co
Leite integral	7	Mín.	2973	748	<LD	11358	1059	<LD	<LD	0,19	0,02
		Max.	4449	876	6,16	13410	9542	0,29	0,87	0,29	0,18
		Média	3826	792	1,29	12508	5570	0,14	0,62	0,24	0,11
		%DPR	14,2	5,10	177	6,60	76,1	95,0	46,3	13,9	66
Bebida láctea	3	Mín.	2478	257	1,75	5584	1691	0,33	0,62	0,10	0,14
		Max.	4862	975	2,97	15378	3812	0,44	1,37	1,38	0,22
		Média	4002	579	2,22	10251	2486	0,37	0,94	0,64	0,17
		%DPR	33,1	62,9	29,6	47,9	46,5	18,4	40,8	103	26
Leite desnatado	2	Mín.	4949	1086	<LD	16911	1338	<LD	<LD	0,27	0,115
		Max.	6267	1238	11,47	17480	1420	0,24	0,24	0,46	0,122
		Média	5608	1162	5,73	17196	1379	0,12	0,12	0,7	0,119
		%DPR	16,6	9,24	141	2,34	4,20	141	141	36,5	4
Fórmula infantil e enriquecidos	10	Mín.	1164	301	<LD	2454	1737	<LD	<LD	0,31	0,02
		Max.	2873	670	1,76	10266	9636	0,31	0,31	20,72	0,19
		Média	2150	483	1,00	7125	5190	0,08	0,08	2,59	0,07
		%DPR	29,3	26,6	52,9	32,1	45,6	162	162	246	85
Alimento com Soja	5	Mín.	838	192	<LD	4630	1234	<LD	<LD	2,84	0,02
		Max.	4753	1608	28,3	12163	8070	<LD	0,46	27,37	0,17
		Média	1961	864	10,2	7796	5133	-	0,23	8,78	0,08
		%DPR	81,4	73,3	110	44,7	52,0	-	88,4	125	76
Leite de Cabra	2	Mín.	5012	1002	<LD	14727	10120	<LD	0,73	0,45	0,041
		Max.	5425	1007	<LD	14912	10600	<LD	1,03	0,92	0,043
		Média	5219	1004	-	14820	10360	-	0,88	0,69	0,042
		%DPR	5,59	0,35	-	0,88	3,28	-	24,0	47,2	4

*Legenda: : n: número de amostras analisadas; Mín.: valor mínimo encontrado; Máx.: valor máximo encontrado; LD: limite de detecção. * A determinação de Ca por realizada por FAAS. DPR: desvio padrão relativo (variação observada entre amostras).*

Fonte: Dados da pesquisa.

Os teores dos elementos avaliados variaram significativamente dentro de cada grupo. Em relação aos macronutrientes (Na, K, Ca, Mg) menores variações foram encontradas para o leite de cabra e uma grande variação foi observada nos alimentos com soja. Além disso, a maior variação nas concentrações de Ca foi obtida no leite integral (0,1 a 0,9%). Este fato é preocupante, pois o leite é tido como a principal fonte de cálcio na dieta humana e o leite integral é um dos produtos mais consumidos com este propósito. Para cálcio, resultados semelhantes foram obtidos para as fórmulas enriquecidas e para os alimentos com soja. Santos e colaboradores (2008) analisaram amostras de leite *in natura* de 32 fazendas de Minas Gerais e obtiveram pequena variação (5 a 12%) nas concentrações dos macronutrientes. A maior variação verificada neste trabalho pode indicar que o processamento das amostras altere a composição de macronutrientes, pois mesmo para as amostras de leite integral essa variação foi significativa.

Para os micronutrientes (Co, Cr, Cu, Mn, Mo e Zn) as menores variações foram observadas no leite de cabra e as maiores, de uma forma geral, nos alimentos enriquecidos. A ANVISA permite a adição de Ca, Cu, Fe, P, I, Zn, Se, Mo, Cr, F, Mn e Mg em alimentos enriquecidos. Desta forma, espera-se que as fórmulas infantis apresentem uma maior variação no teor destes elementos. Num estudo realizado apenas com amostras de leite *in natura*, os teores de micronutrientes variaram de 8 a 41% (SANTOS et al., 2009), indicando que essa maior variação deve ser devida ao processamento das amostras.

Pelos resultados obtidos foi possível observar também que os teores médios de Al, Mn, Ni, Cu e Zn foram superiores nas amostras de alimento com soja. As propriedades da soja de absorção de nutrientes do solo devem ser levadas em consideração no estudo dessa tendência, o que pode acarretar em um aumento do conteúdo mineral dos alimentos com soja. Os teores de Rb e K foram inferiores para a maioria dessas amostras. Os elementos Cr e Cu apresentaram-se em menores concentrações nas amostras de leite desnatado enquanto o Mo apresentou-se em menor teor (abaixo do LD) nas amostras de bebida láctea e leite desnatado. Com relação aos macronutrientes, os teores de Na, K e Mg foram superiores nas amostras de leite

desnatado e leite de cabra, enquanto os de Ca foram superiores em leite de cabra e inferiores em leite desnatado e bebida láctea.

Dentre os elementos tóxicos, alumínio foi o que apresentou as maiores concentrações nas amostras analisadas. Seu teor foi mais elevado nas amostras de alimento com soja e em uma amostra de leite desnatado. Embora as concentrações de Ba não tenham variado muito, os valores foram um pouco maiores nos alimentos com soja. O maior teor de As, Cd e Sb foi observado nas amostras de alimentos enriquecidos e de leite de soja, entretanto as concentrações encontradas foram menores do que as permitidas pela Portaria nº 685 da ANVISA (ANVISA 1998).

Com os dados obtidos realizou-se a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) visando obter uma possível correlação da composição química com o tipo de amostra. Uma única matriz de dados contendo a composição química de todas as amostras foi processada no programa Statistica, para a obtenção de resultados de HCA. Essa análise foi realizada usando dados auto-escalados e o método de Ward como critério de distância entre agrupamentos. Uma possível forma de discriminação entre as amostras seria a semelhança entre as composições minerais. Três agrupamentos foram diferenciados pela HCA (figura 3.1) das amostras: o grupo caracterizado pelas amostras I1, I2, I3, M3, D1, D2 (grupo A), o grupo caracterizado pelas amostras M1, F1, F4, F7, DE1, IE1, I4, I5, I6, F5, S1, S3, C1 e C2 (grupo B) e o grupo caracterizado pelas demais (grupo C). Os grupos foram subdivididos para melhor análise (figura 3.1).

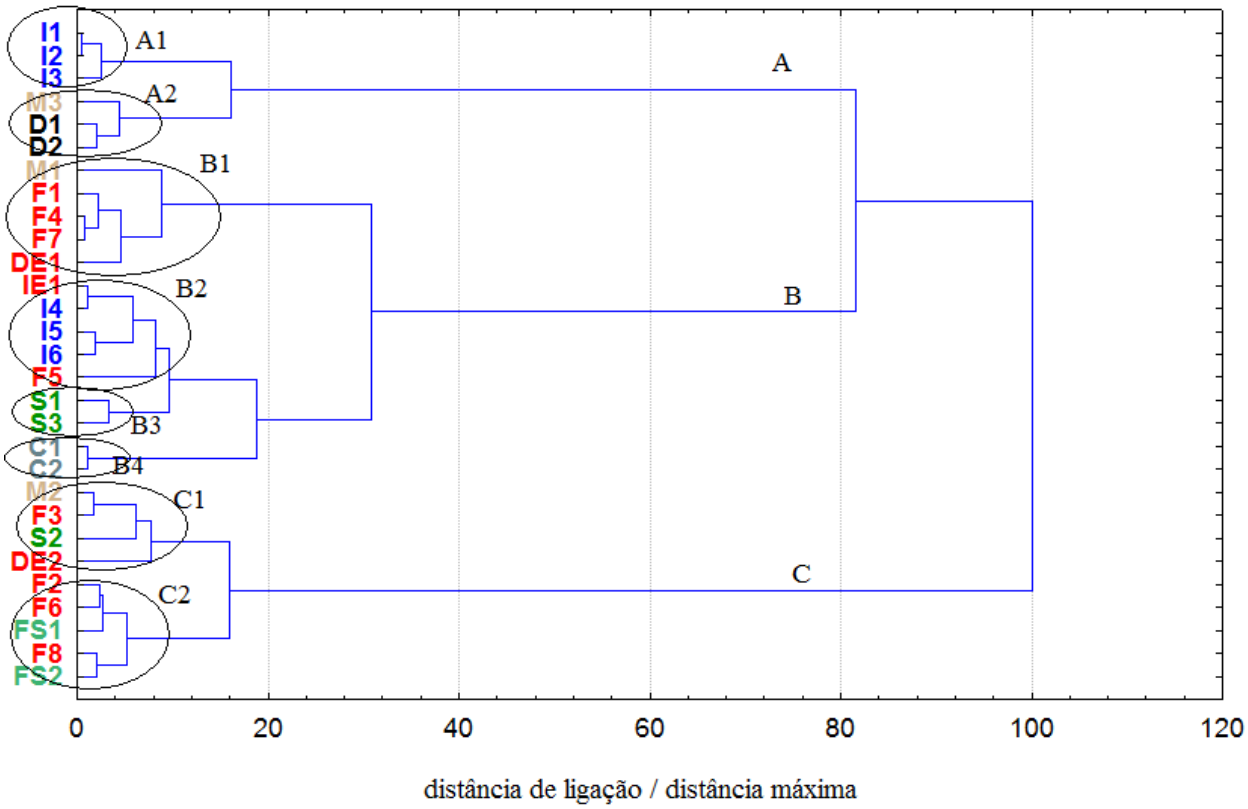

Figura 3.1 Dendrograma das amostras obtido pela HCA usando método de Ward.

Analisando os resultados, verifica-se:

- o grupo A caracteriza-se por amostras com concentrações superiores de Na, Mg e Rb. Os teores de Ca e Cu porém, são inferiores nas demais amostras dos outros grupos. O subgrupo A1 (leite integral) se diferencia de A2 (leite desnatado e bebida láctea) pelas concentrações superiores de Co e K, sendo que o grupo A2 destaca-se pelos teores superiores de Ba em relação a todas as amostras.
- O grupo B se destaca pelas altas concentrações de Ca. Dentro deste grupo, podemos destacar os seguintes pontos:
  - os subgrupos B2 (leite integral), B3 (bebida de soja) e B4 (leite de cabra) se diferenciam de B1(formula enriquecida) pelas concentrações de Mg, que nestes três subgrupos, superam todos os demais grupos.
  - Os teores de K em B2 e B4 são os maiores entre todas as amostras. Além disso, as amostras do subgrupo B4 se destacam pelos altos teores de Rb.

- As amostras do subgrupo B3 são as mais ricas em Mg, Al, Mn, Ni, Ca, Cu, Mo, Ba e Zn.

- o grupo C caracteriza-se por amostras com concentrações superiores de Mn e Cu**.** Os teores de K, porém, são inferiores às demais amostras dos outros grupos. O grupo C1 (fórmula enriquecida, bebida láctea e bebida de soja) se diferencia de C2 (fórmula enriquecida sem e com soja) pelos seus teores inferiores de Mg em relação a este último.

Mesmo em um grupo de amostras similares, não foi possível obter uma classificação pelo tipo de alimento. De uma forma geral, fica evidente pelo dendrograma que a composição das amostras de leite e alimentos infantis similares apresentaram grande variabilidade na composição em relação aos constituintes inorgânicos.

CAPÍTULO IV. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES POR FAAS

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Instrumentação e reagentes

As análises foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com chama modelo Aanalyst 300 equipado com um corretor de absorção de fundo com fonte contínua (lâmpada de arco de deutério), todos da marca Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA). Acetileno (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás combustível e ar comprimido foi empregado como oxidante. Lâmpada de cátodo oco da marca Perkin Elmer, operando nas condições recomendadas pelo fabricante, foi empregada como fonte de radiação. As condições utilizadas são apresentadas na tabela 4.1. No preparo das amostras foi utilizado banho de ultrassom Ultra Cleaner, modelo 1400 A (Indaiatuba, São Paulo, Brasil).

Tabela 4.1 Condições instrumentais utilizadas na determinação de Zn em amostras de leite e similares por FAAS.

Parâmetro	Valores
Corrente da lâmpada (mA)	15
Comprimento de onda (nm)	213,9
Fenda (nm)	0,7
Vazão de Acetileno (L min^{-1})	2,5
Vazão de ar (L min^{-1})	10,0

Água deionizada com baixa resistividade (<18,2 MΩ cm) utilizada no preparo das soluções e amostras foi obtida em um sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA). A solução estoque com concentração de 1000 mg L^{-1}

utilizada para preparo das soluções de referência de Zn foi obtida a partir da diluição de ampola Titrisol Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha) em ácido nítrico a 5% v/v (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todas as soluções de referência utilizadas foram preparadas diariamente através de diluição adequada da solução estoque.

4.1.2 Amostras

Amostras em pó de leite e similares foram adquiridas no mercado de Belo Horizonte, conforme descrito no Capítulo III, seção 3.1.3. As amostras analisadas foram leite integral (I1, I2, I3 e I4), bebida láctea (M1 e M2), leite desnatado (D1), leite integral enriquecido (IE1), fórmula infantil (F1 e F2), leite semi-desnatado enriquecido (DE1 e DE2) e alimento com soja (S1). Estas amostras foram preparadas pesando-se exatamente cerca de 2,6000 a 4,5000 g do pó e reconstituindo-se para 25,00 mL (quantidades proporcionais às recomendações do fabricante), usando água deionizada de baixa resistividade (<18,2 MΩ cm).

Na reconstituição, a sonicação por um período entre 10 e 30 minutos foi necessária para facilitar a solubilização e estabilização da suspensão. Para a amostra de alimento de soja, o tempo de sonicação foi de 50 minutos, devido à maior dificuldade de solubilização. O tempo de sonicação foi determinado pela observação da suspensão, que foi considerado adequado quando gerou maior solubilização da amostra e suspensões com o mínimo de decantação até o momento das leituras.

Após reconstituição, as amostras foram diluídas adequadamente, de forma a apresentarem concentrações analíticas de Zn inseridas na faixa linear de calibração. Os fatores de diluição empregados foram: amostras de leite integral I1, I2, I3 e I4, leite desnatado D1 e leite integral enriquecido IE1 foram diluídas dez vezes; as amostras de bebida láctea M1 e M2, duas vezes; as amostras de fórmula infantil F1 e F2 e a amostra de leite semi-desnatado enriquecido DE1,vinte vezes e as amostras de leite semi-desnatado enriquecido DE2 e alimento com soja S1 foram diluídas cem vezes.

4.1.3 Avaliação do desempenho do método

As características analíticas foram obtidas para verificação do desempenho do método e avaliadas segundo os seguintes critérios, citados na seção 1.4:

- Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelo critério IUPAC[1] (equações 2 e 3, seção 1.4).
- Efeito de matriz: avaliação da resposta analítica frente à presença dos constituintes da matriz por meio de construção de curvas de adição de analito (método de adição de padrão), comparando-se as inclinações destas curvas com curvas de rotina (aquosas) obtidas nas mesmas condições de análise (condições de repetitividade: mesmo dia, mesmo instrumento, mesmo analista)
- Exatidão: comparação dos resultados com aqueles obtidos pela técnica ICP-MS na determinação de zinco, bem como estudos de adição e recuperação de analito.
- Precisão: análise de diversas amostras com diferentes concentrações em triplicata, obtendo-se os desvios-padrão relativos mínimo e máximo para o método.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Características de desempenho do método

Curvas de calibração foram obtidas na faixa de 0,0 a 1,0 mg L^{-1} usando cinco níveis de concentração (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L^{-1}) com coeficientes de correlação (r) próximos de 1,00.

Para estudos do efeito de matriz, as amostras foram divididas em grupos de acordo com o tipo:

- Grupo A1: amostras de leite integral, total de 5 amostras;
- Grupo A2: amostra de leite desnatado, 1 amostra;
- Grupo A3: amostras de bebida láctea, total de 2 amostras;
- Grupo A4: fórmulas infantis e semi-desnatado enriquecido, total 4 amostras;

[1] União Internacional de Química Pura e Aplicada.

- Grupo A5: amostra de alimento de soja, 1 amostra.

Para simular todos os prováveis efeitos de matriz existentes em cada tipo de amostra, uma nova amostra foi sintetizada para cada grupo, pela mistura de volumes iguais de cada amostra pertencente ao grupo. As novas amostras foram denominadas:

- A1 - amostra composta de todas as amostras do grupo 1;
- A2 - amostra D1 (grupo 2);
- A3 - amostra composta de todas as amostras do grupo 3;
- A4 - amostra composta de todas as amostras do grupo 4;
- A5 - amostra S1 (grupo 5).

A partir daí foram construídas curvas de calibração aquosas e curvas de adição com cada amostra composta usando quatro níveis de concentração (0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg L^{-1}), para verificar o desempenho do método e também estudar os efeitos de matriz. Os resultados deste estudo podem ser visualizados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 Resultados da calibração através de curvas de adição de analito e curvas aquosas para as amostras compostas.

	Curvas de adição		Curvas aquosas [a]	
Amostra	Inclinação e desvio obtido pela regressão	*r*	Inclinação e desvio obtido pela regressão	*r*
A1	0,1710 ± 0,0118	0,9929	0,1652 ± 0,0048	0,9974
A2	0,2738 ± 0,0009	0,9946	0,2724 ± 0,0001	0,9946
A3	0,1674 ± 0,0027	0,9996	0,1619 ± 0,0035	0,9986
A4	0,3027 ± 0,0020	0,9913	0,3014 ± 0,0135	0,9940
A5	0,2642 ± 0,0119	0,9982	0,2632 ± 0,0087	0,9954

[a] Curvas aquosas obtidas em condições de repetitividade em relação à curva de adição de analito.

Comparando as inclinações das curvas obtidas em condições de repetitividade[2] (foram realizadas leituras de absorvância das soluções preparadas para a curva de adição e para a curva aquosa no mesmo dia, mesmo equipamento, mesmas condições de leitura e mesmo analista) verifica-se que as inclinações de todas as curvas de adição de analito são estatisticamente semelhantes à inclinação da curva aquosa (teste *t* e *f*, limite de confiança de 95%). Isso sugere uma calibração aquosa para determinação de Zn nas amostras de leite integral, bebida láctea, leite desnatado, bebida de soja e fórmulas infantis em pó visto que não há efeito de matriz sobre o sinal do analito.

Os outros parâmetros analíticos de mérito do método obtidos pela calibração aquosa são apresentados na Tabela 4.3.

O limite de detecção (LD) de (3,00 ± 0,04) $\mu g\ L^{-1}$ foi calculado pelo critério IUPAC e foi considerado satisfatório, uma vez que Silvestre e colaboradores (2000) obtiveram LD de 22 $\mu g\ L^{-1}$ na determinação de Zn em leite humano por FAAS após mineralização da amostra por micro-ondas e Bermejo e colaboradores (1997) obtiveram valor de 11 $\mu g\ L^{-1}$ na determinação de Zn em leite integral líquido. Considerando-se o preparo das amostras, o LD e LQ foram respectivamente de 0,60 e 2,25 mg kg^{-1}. Recuperações variando de 94 a 113 % foram obtidas nos estudos de exatidão empregando quantificação de Zn em amostras fortificadas (0,10 a 0,60 mg L^{-1}). Comparativamente, valores de recuperação de 95,9% (SILVESTRE et al., 2000) e 93 a 100,5 % (BERMEJO et al., 1997) são descritos na literatura na determinação de Zn em leite por FAAS. A precisão foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR), sendo que estes valores se apresentaram entre 0,3 e 2,7% e foram considerados satisfatórios. Valores de precisão de 8,9 % (SILVESTRE et al., 2000) e na faixa de 0,4 a 1,9% (BERMEJO et al., 1997) foram obtidos por diferentes trabalhos que descrevem a análise de leite por FAAS.

[2] Repetitividade se refere às repetições de análise sob as mesmas condições de medição (INMETRO, 2010).

Tabela 4.3 Características de desempenho do método empregado na determinação de Zn em amostras de leite.

Parâmetros	Resultados [a]
Faixa de trabalho linear (mg L^{-1})	0,011 a 1,000
Limite de detecção, LD (μg L^{-1})	(3,00 ± 0,04)
Limite de detecção, LD (mg kg^{-1})	(0,600 ± 0,008)
Limite de quantificação (μg L^{-1})	(11,3 ± 0,1)
Limite de quantificação (mg kg^{-1})	(2,25 ± 0,03)
Precisão, DPR (%),	0,30 a 2,70
Recuperação (0,10 a 0,60 mg L^{-1}) (%)	94,0 a 113

[a] Os valores entre parênteses referem-se à média ± desvio padrão.

A exatidão foi avaliada também por meio da comparação dos resultados da análise de três amostras pelo método proposto com aqueles obtidos empregando a decomposição ácida em micro-ondas e ICP-MS (tabela 4.4). Não houve diferença significativa para um limite de confiança de 95% (testes *F* e *t*) entre os dois métodos avaliados, indicando que a exatidão foi satisfatória.

Neste caso não foram utilizados materiais de referência certificados, pois o único que estava disponível na época apresentou problemas no momento do preparo. Talvez devido a um armazenamento inadequado, não foi possível obter uma suspensão estável deste material (a suspensão apresentava rápida decantação e baixa solubilidade, impossibilitando leituras com precisão adequada).

Tabela 4.4 Resultados obtidos através do método proposto e do método de determinação de Zn por ICP-MS após decomposição ácida em micro-ondas.

Identificação	Concentração de Zn[a], μg g^{-1}	
	Decomposição, ICP-MS (n=3)	Método Proposto, FAAS (n=5)
Amostra I3	38,1 ± 4,3	34,4 ± 2,1
Amostra IE1	30,6 ± 0,4	30,5 ± 0,8
Amostra D1	40,6 ± 3,2	40,8 ± 0,9

[a] Média ± desvio padrão.

4.2.2 Aplicação do método

O método foi aplicado na determinação de Zn em amostras de leite e alimentos infantis similares. Os resultados podem ser visualizados na tabela 4.5.

A maioria dos resultados se encontra na faixa de 30,5 a 46,5 μg g^{-1} de Zn, à exceção das amostras de bebida láctea (2,27 ± 0,18 e 3,31 ± 0,31μg g^{-1}) e da amostra de fórmula infantil DE2 (189 ± 4 μg g^{-1}). A ingestão de dois copos (500 mL) desta amostra reconstituída corresponde a uma ingestão de cerca de 14 mg de Zn, sendo que a ingestão diária recomendada para crianças varia de 2,8 a 5,6 mg (dependendo da idade) e para adultos é de 7 mg (ANVISA, 2005). Os níveis de Zn que produzem efeitos nocivos à saúde são de 15 mg dia^{-1} para o homem e 12 mg dia^{-1} para a mulher (AZEVEDO; CHASIN, 2003), sendo que a ingestão de níveis 0,5 a 2,0 mg/kg/dia de Zn por longos períodos compromete a absorção de Cu, mostrando sintomas bastante claros da deficiência deste último (ASTDR, 2005).

Tabela 4.5 Concentrações de zinco em amostras de leite e alimentos infantis similares determinadas pelo método proposto e sua contribuição na ingestão deste micronutriente.

Amostras	Concentração[a] (μg g^{-1}), n=5	Ingestão correspondente[b] (mg)
Leite integral I1	38,5 ± 2,7	2,89 ± 0,20
Leite integral I2	38,9 ± 2,1	2,92 ± 0,16
Leite integral I3	34,4 ± 2,1	2,58 ± 0,16
Leite integral IE1	30,5 ± 0,8	2,29 ± 0,06
Leite integral I4	40,1 ± 1,6	3,01 ± 0,12
Bebida láctea M1	3,31 ± 0,31	0,248 ± 0,023
Bebida láctea M2	2,27 ± 0,18	0,170 ± 0,014
Fórmula infantil F1	34,6 ± 2,2	2,60 ± 0,17
Fórmula infantil F2	35,4 ± 0,5	2,66 ± 0,04
Alimento de soja S1	39,5 ± 4,0	2,96 ± 0,30
Leite desnatado D1	40,8 ± 0,9	3,06 ± 0,07
Fórmula infantil DE1	46,5 ± 2,7	3,49 ± 0,20
Fórmula infantil DE2	189 ± 4	14,2 ± 0,3

[a] Média ± desvio padrão.
[b] Considerando a amostra reconstituída em um volume de 500 mL (dois copos de leite).

A concentração crítica (189 ± 4 mg kg^{-1}) na fórmula infantil DE2 mostra a importância do controle de qualidade de amostras de leite e outros alimentos, uma vez que existe uma grande variedade de produtos industrializados enriquecidos. Além disso, foi possível verificar que as bebidas lácteas apresentam uma concentração muito baixa deste nutriente essencial e, portanto, não são alimentos que possam ser utilizados em substituição ao leite, no que se refere ao zinco. Estes resultados evidenciam a importância do monitoramento da alimentação das crianças.

CAPÍTULO V. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM LEITE E ALIMENTOS INFANTIS SIMILARES POR GFAAS

5. 1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Instrumentação

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de absorção atômica modelo Aanalyst 300 equipado com um atomizador forno de grafite HGA 800, amostrador automático AS-72 e corretor de absorção de fundo com fonte contínua (lâmpada de arco de deutério), todos da marca Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA). Utilizou-se tubos de grafite pirolítico, com e sem plataforma de L´vov (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Durante o processo de otimização e análise das amostras, optou-se por medidas de absorvância integrada como forma de medida do sinal analítico. Argônio (99,996%, White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás inerte. Lâmpadas de cátodo oco da marca Perkin Elmer, operando nas condições recomendadas pelo fabricante, foram empregadas como fonte de radiação. As condições utilizadas são apresentadas na tabela 5.1. No preparo das amostras utilizou-se um banho de ultrassom Ultra Cleaner, modelo 1400 A (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). O processo de otimização multivariada foi realizado empregando os programas Microsoft Excel e Statistica 6.0.

Tabela 5.1 Condições instrumentais recomendadas pelo fabricante e empregadas no desenvolvimento dos métodos para a determinação de Al, Cr, Mn e Mo por GFAAS.

Parâmetro	Al	Cr	Mn	Mo
Corrente da lâmpada (mA)	25	30	30	25
Comprimento de onda (nm)	309,3	357,9	279,5	313,3
Tempo de leitura (s)	5	5	5	5
Fluxo de argônio (mL min^{-1})	250	250	250	250

5.1.2 Materiais, reagentes e materiais de referência certificados

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água deionizada (resistividade ≥ 18,2 MΩ cm) utilizada no preparo das soluções e amostras foi obtida em um sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA). As seguintes soluções foram utilizadas:

- soluções de referência de alumínio (Al), cromo (Cr), manganês (Mn) e molibdênio (Mo) com concentrações de 1000 mg L^{-1}, obtidas a partir da diluição adequada de ampolas Titrisol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Estas soluções foram diluídas adequadamente no preparo das curvas de calibração;

- ácido nítrico concentrado 65% em massa sub-destilado. A purificação do HNO_3 foi realizada em um destilador de ácidos modelo SubPur (Milestone, Sorisole, Itália).

- solução CFA-C 10% v/v, preparada em água deionizada por diluição do reagente comercial (Spectrasol, Warwick, NY, USA) e o pH foi ajustado para 8,0 pela adição de HNO_3. O reagente CFA-C é uma mistura de aminas terciárias.

- solução de cloreto de cetil trimetil amônio (CTAC) a 0,1% v/v, preparada pela diluição do CTAC 25% em massa (Aldrich, Alemanha). Esta solução minimiza a formação de resíduos carbonáceos na plataforma do tubo de grafite quando inserida previamente, o que aumenta o tempo de vida útil do forno de grafite, além de melhorar a precisão do método analítico.

As seguintes soluções de 1000 mg L^{-1} foram utilizadas como modificadores:

- Tungstênio (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Irídio, nióbio, tântalo, rutênio, ródio e zircônio (Fluka, Buchs, Suíça);
- Európio, lutécio, hólmio e érbio (GFS Chemicals, Columbus, USA).

Soluções de Pd e Mg 10 000 mg L^{-1} (Perkin Elmer, Norwalk, USA) também foram utilizadas como modificadores.

Para a avaliação da exatidão dos métodos propostos foram empregados os seguintes materiais de referência certificados:

- Leite desnatado em pó (NIST, *non-fat milk powder*, SRM 1549, Gaithersburg, USA);
- Leite integral em pó (NIST, *whole milk powder*, SRM 8435);
- Fórmula infantil (NIST, *infant formula*, SRM 1846);
- Leite integral em pó (IAEA, *whole milk powder*, SRM 153, Viena, Áustria).

5.1.3 Amostras

Amostras de leite e similares (fórmulas infantis, bebidas lácteas e alimentos de soja) foram adquiridas no comércio de Belo Horizonte, conforme descrito no capítulo III, seção 3.1.3.

As amostras foram preparadas através da reconstituição do produto em pó, conforme as instruções das embalagens (proporção entre 10 e 15 % m/v, de acordo com as recomendações do fabricante, em balança analítica), porém usando-se água deionizada de baixa resistividade (<18,2 MΩ cm). O uso de 10 a 30 minutos de sonicação foi necessário para facilitar a solubilização e estabilização da suspensão. Para a amostra de alimento de soja, o tempo de sonicação foi de 50 minutos, devido à maior dificuldade de solubilização. O tempo de sonicação foi determinado pela observação da suspensão, como descrito na seção 4.1.2. Após o preparo, as amostras foram diluídas quando necessário, conforme as concentrações analíticas presentes de cada elemento nas amostras e a faixa de calibração em cada análise. Foram introduzidos no forno de grafite volumes de 20 μL das soluções finais nas determinações realizadas por GFAAS.

5.1.4 Tratamento dos tubos de grafite com modificadores permanentes

As plataformas ou paredes dos tubos de grafite pirolítico foram tratadas com o modificador adequado por meio de 20 injeções de 25 μL, dentro do tubo de grafite. Após cada injeção, o tubo foi submetido ao programa de aquecimento mostrado na tabela 5.2. O procedimento, já descrito (SILVA et al., 1998), resulta em uma massa total de 500 μg do modificador dispersa na superfície da plataforma no interior do tubo. Esse programa de aquecimento causa a redução do íon metálico presente na solução e volatiliza os concomitantes presentes.

Tabela 5.2 Programa de temperatura utilizado para recobrimento dos tubos de grafite, adaptado (SILVA et al., 1998).

Etapa		Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Fluxo de Argônio (mL min^{-1})
1	Secagem	90	5	15	250
2	Secagem	140	5	15	250
3	Pirólise	1000	10	10	250
4	Atomização	2000	0	5	0
5	Resfriamento	20	1	10	250

5.1.5 Otimização das condições analíticas

Para escolha do melhor modificador, em geral foram realizadas várias medidas de absorvância integrada e sinal de fundo nas condições recomendadas pelo fabricante. Neste estudo foram injetadas alíquotas de 20 μL de amostra em presença de diversos modificadores químicos e observados os perfis de pico de absorção atômica e de absorção de fundo, bem como a sensibilidade e precisão obtidas.

Para a otimização do programa de aquecimento foram realizados planejamentos experimentais e construção de superfícies de reposta. As etapas de pirólise e

atomização são muito importantes na determinação de um elemento por GFAAS e contribuem grandemente para um aumento de sensibilidade e redução da absorção de fundo, quando cuidadosamente otimizadas em conjunto com o modificador adequado.

Quando a concentração do analito na matriz foi insuficiente para se realizar medidas de absorção satisfatórias, adicionou-se uma pequena quantidade do elemento a ser determinado na amostra de forma que o sinal analítico fosse mensurável. No caso da otimização das condições analíticas para determinação de **Mn** e **Mo**, essa adição não foi necessária, pois as concentrações desses analitos na matriz utilizada eram adequadas para otimização. Uma vantagem de não fortificar a amostra com o analito é a possibilidade de realizar estudos mais próximos das condições reais de análise.

5.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO

5.2.1 Otimização das condições analíticas

O modificador químico utilizado na otimização foi Zr permanente. Em um trabalho anterior (AMORIM et al. 2006) foi realizado um estudo do melhor modificador para a determinação direta de Al em refrigerantes. Neste estudo verificou-se que o modificador Zr apresentou um desempenho superior aos demais, mostrando um ganho significativo na sensibilidade para Al sob condições STPF[1]. Esses resultados são confirmados também por outros trabalhos da literatura (PEREIRA-FILHO et al. 2002, PEREIRA et al. 2004).

A etapa de secagem foi otimizada univariadamente através da variação da temperatura e observação do comportamento da amostra durante a etapa de secagem. Durante esta otimização, verificou-se que para a temperatura de secagem de 140 °C houve a formação de uma bolha, que em poucos segundos foi projetada para fora do tubo. Esse problema foi contornado com a diminuição da temperatura de secagem para

[1] Forno com platafoma e temperatura estabilizada, do inglês *"stabilized temperature platform furnace"*

90°C e, simultaneamente, o aumento do tempo de secagem para 60 s, para não comprometer a finalidade desta etapa, que é secar a amostra, sem que ocorra crepitação. O programa de temperatura utilizado na otimização é mostrado na tabela 5.3. Uma temperatura de 2800°C foi utilizada na etapa de limpeza para minimizar efeitos de memória causados pela retenção de Al na plataforma do tubo ao final do programa de temperatura.

Para evitar a formação de resíduos carbonáceos, previamente à introdução da amostra no atomizador (tubo de grafite) foram depositados 5 μL de cloreto de cetil trimetil amônio (CTAC) 0,1% v/v (PINTO et al., 2005) e submeteu-se o tubo a uma etapa prévia de secagem (primeira etapa do programa de temperatura). Uma amostra de leite integral diluída 1:1 e fortificada com 100 μg L^{-1} de Al foi utilizada nas etapas de otimização, pois nas medidas realizadas inicialmente (condições recomendadas pelo fabricante) o sinal analítico obtido para a amostra diluída 1:1 foi baixo.

Tabela 5.3 Programa de temperatura usado na otimização do método para determinação de Al em leite e alimentos infantis similares.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Fluxo de Argônio (mL min^{-1})
Secagem (CTAC)	90	5	5	250
Secagem	90	5	60	250
Pirólise	[a]	10	[c]	250
Atomização	[b]	0	5	0 (leitura)
Limpeza	2800	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

[a,b,c]Variáveis otimizadas.

Um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foi realizado com o objetivo de investigar a influência de algumas variáveis envolvidas no processo de determinação do alumínio: temperaturas de pirólise e de atomização, tempo de duração da pirólise e tipo de diluente (tabela 5.4). O diluente CFA-C foi utilizado como solução a 10% v/v. O CFA-C provavelmente promove total ou parcial dissociação das micelas de caseína,

causando um aumento na concentração de metal na fase aquosa podendo minimizar efeitos de matriz, segundo a literatura (NASCENTES et al., 2004).

Tabela 5.4 Níveis estudados no planejamento fracionário empregado na otimização do método para determinação de Al em leite e similares.

Variável	Nível inferior (-1)	Nível Superior (+1)
Temperatura de pirólise (^{o}C)	1500	1900
Temperatura de atomização (^{o}C)	2400	2600
Tempo de duração da pirólise (s)	30	50
Tipo de diluente	Água	CFA-C

Baseando-se nos resultados obtidos, foram realizados dois planejamentos Doehlert utilizando as variáveis significativas (tabela 5.5 e tabela 5.6) para se obter a condição experimental de máxima sensibilidade. Para efetuar os cálculos foram utilizadas planilhas do Microsoft Excel (TEOFILO; FERREIRA, 2006) e o programa Statistica (Statsoft).

Tabela 5.5 Níveis estudados no primeiro planejamento Doehlert empregado na otimização do método para determinação de Al em leite e similares.

Fatores	Níveis Avaliados[a]
Temperatura de Pirólise (^{o}C)	700 (-1), 1000 (-0,5), 1300 (0), 1600 (0,5), 1900 (1)
Temperatura de Atomização (^{o}C)	2142 (-0,87), 2400 (0), 2658 (+0,87)

[a] Os valores entre parênteses referem-se aos valores codificados.

Tabela 5.6 Níveis estudados no segundo planejamento Doehlert empregado na otimização do método para determinação de Al em leite e similares.

Fatores	Níveis Avaliados[a]
Temperatura de Pirólise (^{o}C)	1500 (-1), 1650 (-0,5), 1800 (0), 1950 (0,5), 2100 (1)
Temperatura de Atomização (^{o}C)	2142 (-0,87), 2400 (0), 2658 (+0,87)

[a] Os valores entre parênteses referem-se aos valores codificados.

5.2.2 Parâmetros de mérito

Para avaliação dos métodos otimizados neste trabalho, os parâmetros de mérito avaliados foram: seletividade, linearidade, massa característica, limite de detecção e de quantificação, precisão e exatidão, os quais foram descritos na seção 1.4.

Para avaliação da seletividade, foi realizado um estudo de efeito de matriz, comparando-se as inclinações da curva de calibração aquosa e da curva de calibração pelo método das adições de padrão. Com este estudo pode se verificar se a resposta do analito é afetada pelos componentes da matriz (ANVISA, 1998). Se as inclinações das curvas de calibração diferirem significativamente pelos testes *F* e *t*, para um nível de confiança de 95%, pode-se concluir que o método é susceptível ao efeito de matriz.

Para este estudo, as amostras foram divididas em grupos de acordo com o tipo:

- Grupo 1: amostras de leite integral em pó, total de 7 amostras
- Grupo 2: amostras de bebida láctea em pó, total de 3 amostras
- Grupo 3: amostras de leite desnatado em pó, total de 2 amostras
- Grupo 4: amostras de fórmulas infantis e enriquecidas em pó, total de 10 amostras
- Grupo 5: amostras de leite integral de cabra em pó, total de 2 amostras
- Grupo 6: amostra de alimento de soja em pó, total de 4 amostras

Para simular todos os prováveis efeitos de matriz existentes em cada tipo de amostra, uma nova amostra foi preparada para cada grupo, através da mistura de volumes iguais de cada amostra pertencente ao grupo. As novas amostras foram denominadas:

- A1 - amostra composta de todas as amostras do grupo 1;
- A2 - amostra composta de todas as amostras do grupo 2;
- A3 - amostra composta de todas as amostras do grupo 3;
- A4 - amostra composta de todas as amostras do grupo 4;
- A5 - amostra composta de todas as amostras do grupo 5;
- A6 - amostra composta de todas as amostras do grupo 6.

A partir daí foram construídas curvas de calibração aquosas (de 0 a 100 μg L^{-1}) e curvas de calibração por adição padrão (de 0 a 100 μg L^{-1}) com cada amostra composta para verificar o desempenho do método otimizado e também estudar os efeitos de matriz.

A linearidade foi avaliada para todas as curvas obtidas por meio do coeficiente de correlação linear e a faixa linear de trabalho foi estabelecida entre o limite de quantificação e o último ponto da curva.

Para determinação da massa característica, mediu-se a área de cada pico correspondente a injeções de 20 μL de soluções aquosas de Al de 10 a 100 μg L^{-1} e calculou-se a massa característica média.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo a IUPAC e para isso mediu-se o sinal analítico de dez brancos independentes e utilizou-se os parâmetros da curva de calibração aquosa.

Para avaliação da precisão (repetitividade) preparou-se soluções aquosas de Al em três concentrações distintas: 25, 50 e 100 μg L^{-1}. Para cada concentração foi preparada uma triplicata e as soluções foram analisadas nas condições otimizadas. Com os resultados obtidos calculou-se o desvio padrão relativo.

A exatidão foi checada pela análise do material de referencia certificado SRM 1549 (NIST). Seu preparo consistiu da solubilização em água deionizada e análise contra a curva aquosa.

5.2.3 Resultados e discussão

5.2.3.1 Otimização das condições analíticas

Os resultados do planejamento fracionário podem ser visualizados na tabela 5.7. Analisando o gráfico de Pareto (figura 5.1), podemos verificar que somente as variáveis temperatura de pirólise (TP) e de atomização (TA) foram significativas para um nível de confiança de 95%, bem como a interação entre ambas. Os efeitos

individuais destas variáveis foram negativos, sugerindo uma diminuição nos valores destas variáveis para obtenção de máximo de resposta (absorvância integrada, A). A interação entre ambas apresentou efeito positivo, o que significa que se obtém uma maior resposta quando se trabalha simultaneamente no nível baixo das duas variáveis. A existência de efeitos significativos de segunda ordem implica em uma elevada relação entre as variáveis. Este fato indica que provavelmente um modelo quadrático é necessário na avaliação da superfície de resposta.

Tabela 5.7 Resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário utilizado na otimização do método para a determinação de Al em leites e similares (n = 2).

Ensaio	TP[a,d] (^oC)	TA[b,d] (^oC)	Tempo[c,d] (s)	Diluente[d]	Abs. integrada (A s^{-1}) (média ± desvio padrão)
1	1500 (-1)	2400 (-1)	30 (-1)	Água (-1)	0,859 ± 0,033
2	1900 (+1)	2400 (-1)	30 (-1)	CFA-C (+1)	0,418 ± 0,038
3	1500 (-1)	2600 (+1)	30 (-1)	CFA-C (+1)	0,483 ± 0,021
4	1900 (+1)	2600 (+1)	30 (-1)	Água (-1)	0,491 ± 0,001
5	1500 (-1)	2400 (-1)	50 (+1)	CFA-C (+1)	0,896 ± 0,008
6	1900 (+1)	2400 (-1)	50 (+1)	Água (-1)	0,350 ± 0,054
7	1500 (-1)	2600 (+1)	50 (+1)	Água (-1)	0,619 ± 0,096
8	1900 (+1)	2600 (+1)	50 (+1)	CFA-C (+1)	0,516 ± 0,077

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Tempo de pirólise. [d] Os valores entre parênteses correspondem ao valor codificado.

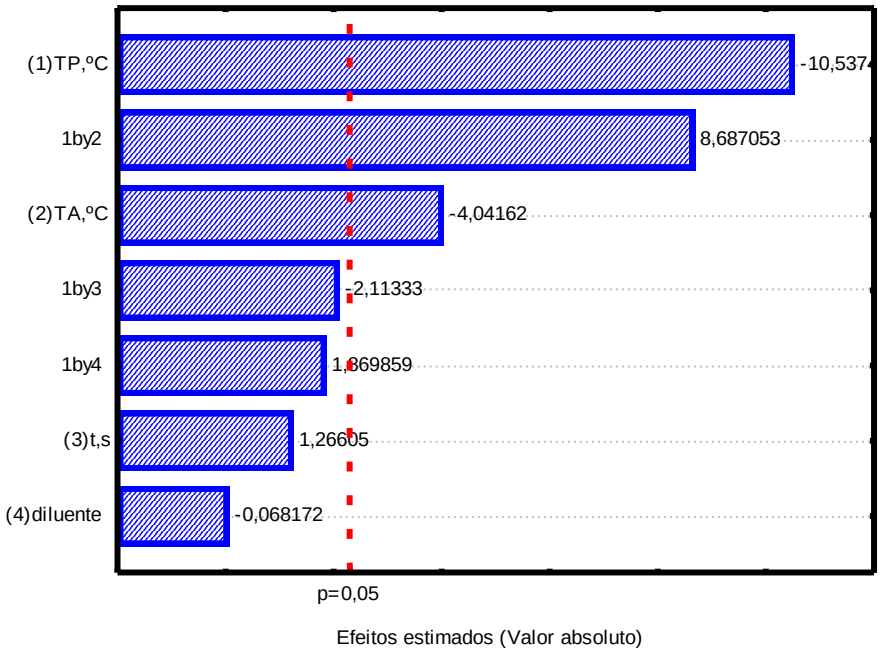

Figura 5.1 Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário (TP: temperatura de pirólise; TA: temperatura de atomização; t: tempo de duração da pirólise) utilizado na otimização do método para determinação de Al em leites e similares.

Após a verificação das variáveis significativas, um planejamento Doehlert foi realizado utilizando as variáveis *TP* e *TA* para confecção da superfície de resposta e para verificação das condições ótimas para determinação de alumínio em leite e similares (tabela 5.5), mantendo constantes as variáveis tempo de pirólise (30 s) e tipo de diluente (água), que não foram significativas (figura 5.1). Os resultados obtidos nesse planejamento podem ser visualizados na tabela 5.8. Os modelos linear e quadrático foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), gráficos de resíduos e coeficientes de variação, sendo que o linear não apresentou um bom ajuste. O modelo quadrático apresentou resultados satisfatórios, e pode ser descrito pela seguinte equação:

$$A = 0{,}702 + 0{,}036[TP] + 0{,}036[TA] - 0{,}496[TP^2] + 0{,}072[TA^2] - 0{,}115[TP][TA]$$

(equação 4)

A superfície de resposta foi construída usando o modelo quadrático e pode ser visualizada na figura 5.2. Analisando a forma da superfície, percebe-se a obtenção de pontos críticos correspondentes a um valor de mínimo para a derivada da função, o que chamamos de *ponto de sela*. Esta situação sugere a construção de um novo planejamento, expandindo o domínio experimental investigado. A figura sugere expansão da temperatura de pirólise (figura 5.2). Novo planejamento Doehlert foi realizado investigando temperaturas de pirólise mais altas (tabela 5.6).

Tabela 5.8 Resultados do primeiro planejamento Doehlert utilizado na otimização do método para a determinação de Al em leites e similares por GFAAS.

Ensaio	TP [a,c] (^oC)	TA[b,c] (^oC)	Abs. integrada (A s^{-1})
1	1900 (1)	2400 (0)	0,176
2	1600 (0,5)	2658 (+0,87)	0,697
3	700 (-1)	2400 (0)	0,236
4	1000 (-0,5)	2142 (-0,87)	0,467
5	1600 (0,5)	2142 (-0,87)	0,735
6	1000 (-0,5)	2658 (+0,87)	0,629
7	1300 (0)	2400 (0)	0,762
8	1300 (0)	2400 (0)	0,689
9	1300 (0)	2400 (0)	0,724
10	1300 (0)	2400 (0)	0,633

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Os valores entre parênteses correspondem ao valor codificado.

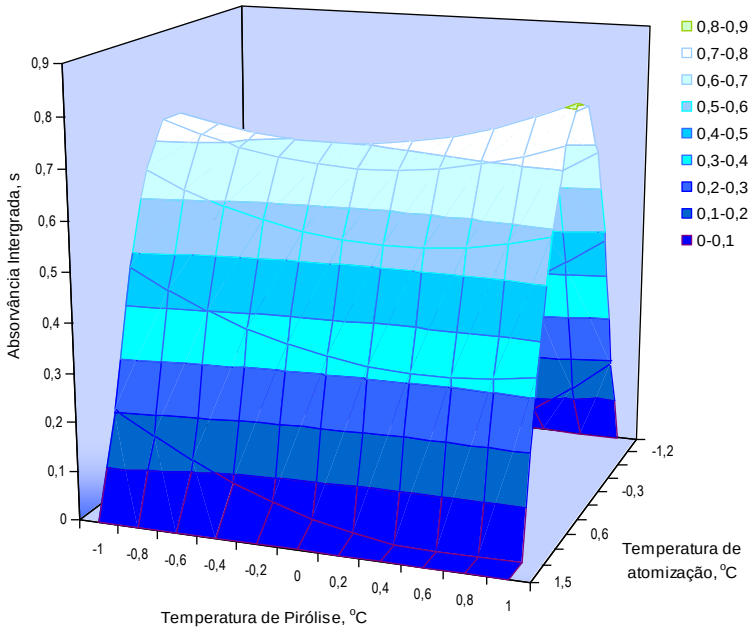

Figura 5.2 Superfície de resposta obtida no primeiro planejamento Doehlert utilizado na otimização do método para determinação de Al em leites e similares. Os valores estão codificados.

Os resultados obtidos no segundo planejamento Doehlert podem ser visualizados na tabela 5.9. Os modelos linear e quadrático foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), gráficos de resíduos e coeficientes de variação, no qual o primeiro não apresentou um bom ajuste. A superfície de resposta foi construída usando o modelo quadrático e pode ser visualizada na figura 5.3.

Tabela 5.9 Resultados do segundo planejamento Doehlert utilizado na otimização do método para a determinação de Al em leites e similares por GFAAS.

Ensaio	TP[a,c] (°C)	TA[b,c] (°C)	Abs. Integrada (A s^{-1})
1	2100 (1)	2400 (0)	0,066
2	1950 (0,5)	2658 (+0,87)	0,538
3	1500 (-1)	2400 (0)	0,783
4	1650 (-0,5)	2142 (-0,87)	0,653
5	1950 (0,5)	2142 (-0,87)	0,267
6	1650 (-0,5)	2658 (+0,87)	0,723
7	1800 (0)	2400 (0)	0,719
8	1800 (0)	2400 (0)	0,716
9	1800 (0)	2400 (0)	0,755
10	1800 (0)	2400 (0)	0,735
11	1800 (0)	2400 (0)	0,739

[a]Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Os valores entre parênteses correspondem ao valor codificado.

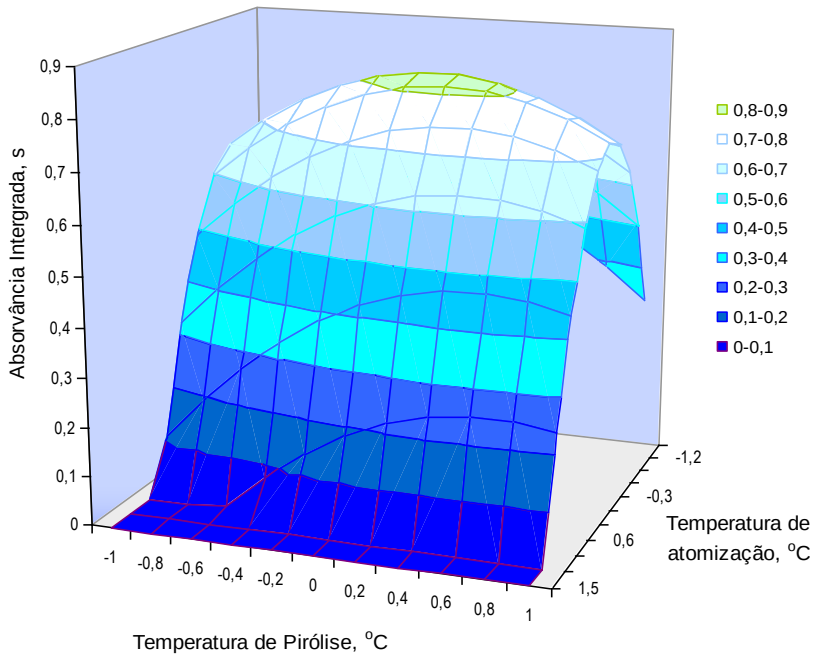

Figura 5.3 Superfície de resposta obtida no segundo planejamento Doehlert. Os valores estão codificados.

Analisando a forma da superfície (figura 5.3), percebe-se a obtenção de pontos críticos correspondentes a um valor de máximo para a derivada da função, o que corresponde ao ponto ótimo experimental. O modelo quadrático apresentou resultados satisfatórios onde se obteve a seguinte equação:

$$A = 0{,}733 - 0{,}334[TP] + 0{,}098[TA] - 0{,}308[TP^2] - 0{,}147[TA^2] + 0{,}116[TP][TA]$$

(equação 5)

Analisando as coordenadas do ponto crítico e decodificando-as, foram obtidos os valores de TP = 1500 °C e TA = 2500 ºC. Com isso, essas condições experimentais foram fixadas para a determinação de Al em leite e similares por GFAAS.

Para fins de comparação, foram construídas as curvas de temperatura de pirólise (TP) e de atomização (TA). A curva de TP foi obtida fixando-se TA em 2400ºC (condições recomendadas pelo fabricante) e a curva de TA foi obtida fixando-se o valor de TP otimizado previamente pela mesma curva de TP (1800ºC). Pela otimização univariada (construção de curvas de pirólise e de atomização), obteve-se TP = 1800°C e TA = 2300ºC (figura 5.4). Também em condições univariadas, Pereira e colaboradores (2004) encontraram valores de 1100º e 2500ºC para temperatura de pirólise e atomização, respectivamente, na determinação de Al em águas de abastecimento usando Zr como modificador. Arruda e colaboradores (1994) obtiveram valores de 1500ºC e 2600 ºC para temperatura de pirólise e atomização, respectivamente, na determinação de Al em leite usando $Mg(NO_3)_2$ como modificador. Pode-se observar que existem diferenças nas temperaturas obtidas univariadamente e multivariadamente, embora em alguns casos esta diferença pareça pequena. Contudo, TP e TA variam para cada modificador utilizado e as interações entre estas variáveis devem ser avaliadas para que se obtenha o máximo de sensibilidade para o método otimizado.

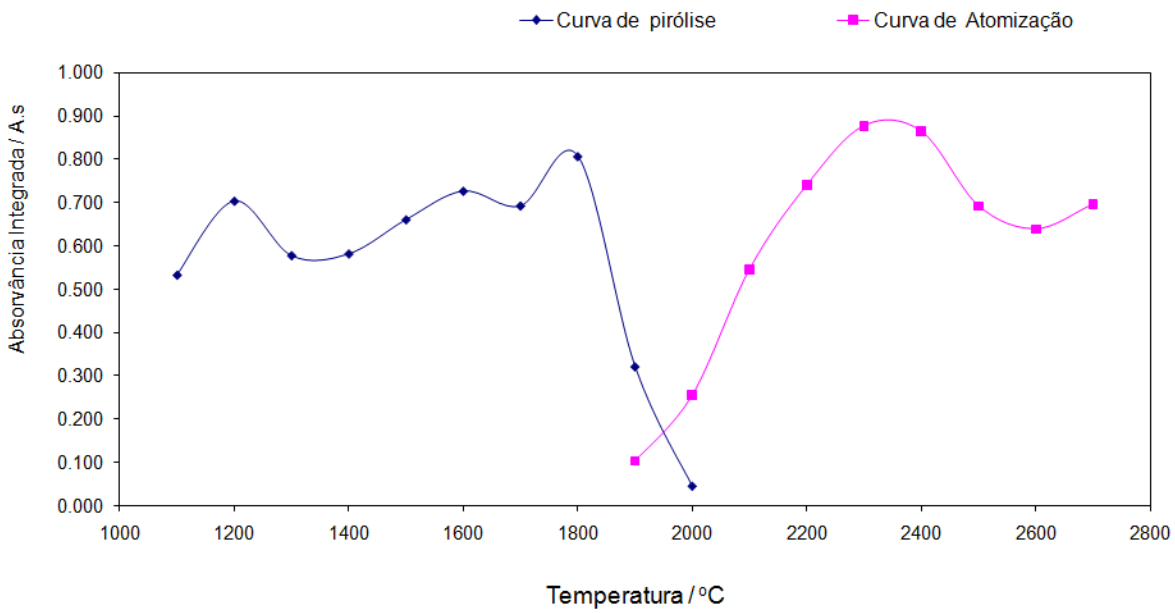

Figura 5.4 Curvas de pirólise e atomização obtidas univariadamente para Al em leite usando Zr como modificador permanente.

5.2.3.2 Parâmetros de mérito

As características analíticas foram determinadas nas condições otimizadas pelo método multivariado (tabela 5.11), levando-se em consideração parâmetros e métodos citados na seção 1.4. Para se estabelecer a estratégia de calibração, o primeiro parâmetro avaliado foi o efeito de matriz. Neste estudo, as amostras foram agrupadas por similaridade, de acordo com o descrito na seção 5.2.2. Para cada grupo preparou-se uma curva por adição de padrão e comparou-se com a curva aquosa preparada e analisada no mesmo dia e em condições idênticas (condições de repetitividade). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 5.10.

Tabela 5.10 Resultados obtidos na avaliação do efeito de matriz na determinação direta de Al em leite e amostras similares por GFAAS.

	Curvas de adição				Curvas aquosas [a]			
Amostra	Inclinação e desvio obtido pela regressão			*r*	Inclinação e desvio obtido pela regressão			*r*
A1	0,00341	±	0,00017	0,9962	0,00309	±	0,00015	0,9956
A2	0,00325	±	0,00013	0,9973	0,00335	±	0,00008	0,9987
A3	0,00290	±	0,00014	0,9952	0,00309	±	0,00015	0,9956
A4	0,00223	±	0,00009	0,9967	0,00309	±	0,00015	0,9956
A5	0,00260	±	0,00015	0,9949	0,00309	±	0,00015	0,9956
A5	0,00245	±	0,00012	0,9963	0,00335	±	0,00008	0,9987
A6	0,00222	±	0,00006	0,9986	0,00309	±	0,00015	0,9956

[a] Curvas aquosas obtidas em condições de repetitividade em relação à curva de adição de analito correspondente.

Os coeficientes de correlação (*r*) das curvas de calibração apresentaram-se adequados, com valores de *r* superiores a 0,9900 e todas as curvas apresentaram aspecto linear.

Comparando as inclinações das curvas realizadas em condições de repetitividade, verifica-se que as inclinações das curvas de adição de A1, A2 e A3 são estatisticamente semelhantes à inclinação da curva aquosa (nível de confiança de 95%), ao contrário das demais. Isso sugere uma calibração aquosa para determinação de Al nas amostras de bebida láctea, leite integral e amostras de leite desnatado, visto que não há efeito de matriz sobre o sinal do analito. Vale ressaltar que a otimização foi realizada com uma amostra de leite integral, o que pode justificar esse resultado. No método otimizado as etapas de pirólise e atomização conseguem promover uma eficiente eliminação da matriz e atomização do analito nas amostras com características semelhantes às da amostra utilizada na otimização (leite integral, leite desnatado e bebida láctea). Desta forma, a calibração utilizando padrões aquosos foi viável. Provavelmente se a otimização fosse realizada separadamente para as amostras de alimentos enriquecidos, leite de cabra e alimentos a base de soja, a mesma

estratégia de calibração poderia ser empregada. Entretanto, neste trabalho optou-se por analisar as amostras dos grupos A4, A5 e A6 pelo método das adições de analito. Esses resultados mostram ainda a grande variabilidade na composição destas amostras e a influência deste fator em métodos que envolvem a determinação direta.

Os demais parâmetros analíticos de mérito foram obtidos baseados na calibração aquosa e podem ser visualizados na tabela 5.11.

Tabela 5.11 Características de desempenho do método otimizado para determinação de Al em leites e similares por GFAAS, empregando calibração aquosa.

Parâmetros	Resultados[d]
Faixa de trabalho linear (μg L^{-1})	6,5 a 100
Limite de detecção, LD (μg L^{-1})	(1,93 ± 0,11)
Limite de detecção, LD (μg kg^{-1})	(38,6 ± 2,2)
Limite de quantificação, LQ (μg L^{-1})	(6,45 ± 0,35)
Limite de quantificação, LQ (μg kg^{-1})	(129,0 ± 7,0)
Precisão[a], DPR (%),	4,2 a 10,7
Exatidão[b] (SRM 1549, μg g^{-1})	(2,01 ± 0,38)
Massa característica[c] (pg)	(9,7 ± 2,6)

[a] 3 amostras, níveis de concentração 25, 50 e 100 μg L^{-1}. [b] Valor informado: 2 μg g^{-1}. [c] Massa característica recomendada: 10 pg. [d] Os valores entre parênteses referem-se à média ± desvio padrão.

O limite de detecção de (1,93 ± 0,11) μg L^{-1} apresentou-se elevado em relação ao trabalho de Arruda e colaboradores, que obtiveram LD de 0,32 μg L^{-1} pelo mesmo critério e utilizando $MgNO_3$ como modificador químico na faixa de trabalho de 0-50 μg L^{-1} (ARRUDA et al., 1994). Welz e Sperling registraram LD de 0,10 μg L^{-1} em soluções de calibração livre de matriz (WELZ; SPERLING, 1999). Possivelmente esta diferença deve-se aos altos valores de branco obtidos. Devido a sua grande abundância, contaminações por Al são relativamente frequentes. Amorim e colaboradores (AMORIM et al., 2006) obtiveram LD de 11,3 μg L^{-1} ao utilizar Zr como modificador permanente para otimização em presença da matriz (refrigerante).

O método apresentou sensibilidade satisfatória, com massa característica próxima ao valor recomendado - massa característica média de (9,7 ± 2,6) pg, sendo a recomendada de 10 pg.

A precisão em termos de repetitividade apresentou resultados satisfatórios, com um desvio padrão relativo máximo de 10,7% (GUILHEN et al., 2010; HUBER, 2001). A concentração de Al no material de referência certificado utilizado era apenas informado, entretanto o valor obtido foi estatisticamente igual ao valor informado, para um nível de 95% de confiança (Tabela 5.11) indicando que a exatidão do método é adequada.

5.2.3.3 Aplicação do método

Os resultados obtidos para as determinações de Al em várias amostras de leite e alimentos similares são mostrados na tabela 5.12. A concentração de Al foi determinada através de curvas de calibração aquosas e curvas de calibração pelo método de adição de analito, de acordo com o indicado na avaliação do efeito de matriz.

A faixa de concentrações, em $\mu g\ g^{-1}$, obtida para cada grupo de amostras foi: em leite integral, 0,77 a 5,01 (n=7); em bebida láctea, 2,69 a 9,04 (n=2); em leite desnatado 3,41 a 8,21 (n=2); em fórmulas infantis, 4,81 a 12,12 (n=6); em bebida de soja, 3,70 a 44,87 (n=3). O conteúdo de Al foi maior em uma amostra de bebida de soja e na maioria das fórmulas infantis (tabela 5.12). Em termos gerais é esperado que as amostras de bebida de soja apresentem um conteúdo maior de Al quando comparadas às demais, devido principalmente a matéria-prima utilizada. Os solos brasileiros são ácidos, o que possibilita a absorção de Al pelas plantas. Consequentemente, altas concentrações de Al podem ser encontradas em soja. A EPA recomenda níveis máximos de 0,2 mg L^{-1} em água para consumo humano, porém estes dados são baseados em gosto, odor ou cor (ATSDR, 2006). Comparativamente, Dabeka e Mackenzie (1992) encontraram níveis de Al de 0,23 a 5,2 $\mu g\ g^{-1}$ em bebidas à base de soja e <0,011 a 0,66 $\mu g\ g^{-1}$ em bebidas à base de leite, todos estes alimentos

prontos para consumo. Em outro trabalho, Saracoglu e colaboradores (2007) encontraram teores de 10,7 a 66,8 μg g^{-1} de Al em 19 amostras de fórmulas infantis por GFAAS.

Tabela 5.12 Concentrações de Al em diferentes amostras de leite e similares obtidas pelo método proposto.

Amostra	Concentração de Al[a], μg g^{-1}
Leite integral I1	1,92 ± 0,29
Leite integral I2	5,01 ± 1,53
Leite integral I3	1,70 ± 0,15
Leite integral enriquecido IE1	1,74 ± 0,57
Leite integral I4	0,77 ± 0,14
Leite integral I5	2,11 ± 0,24
Leite integral I6	2,46 ± 0,47
Leite desnatado D1	3,41 ± 1,20
Leite desnatado D2	8,21 ± 1,78
Fórmula infantil F1	7,97 ± 3,46
Fórmula infantil F2	12,1 ± 0,96
Fórmula infantil DE2	4,81 ± 1,25
Fórmula infantil F3	11,4 ± 1,86
Fórmula infantil F5	6,36 ± 0,33
Fórmula infantil F7	11,7 ± 3,44
Bebida de soja S1	44,9 ± 3,0
Bebida de soja S3	3,70 ± 1,29
Fórmula infantil à base de soja FS2	9,85 ± 0,86
Bebida láctea M1	2,69 ± 0,39
Bebida láctea M2	9,04 ± 0,88

[a] Média ± desvio padrão, n=3

Considerando o maior teor encontrado nas amostras (44,9 μg g^{-1}), após a reconstituição segundo as recomendações do fabricante (15% m/v), a concentração de Al na bebida de soja será de 6,74 mg L^{-1}, o que é bem superior ao teor permitido em água para consumo. Obviamente deve-se considerar que o consumo de água deve ser bem maior que o consumo destes alimentos.

5.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CROMO

5.3.1. Otimização das condições analíticas

Para escolha do modificador permanente mais adequado foram realizadas várias medidas de absorvância integrada e sinal de fundo nas condições recomendadas pelo fabricante, sendo injetado um volume de 20 μL de amostra de leite integral diluída 1:1 com água deionizada, em tubos tratados com os modificadores químicos permanentes W, Ru, Rh, Ir e também em um tubo sem modificador.

A etapa de secagem foi otimizada como descrito na seção 5.2.1. O programa de aquecimento utilizado na otimização é mostrado na tabela 5.13. Como descrito para o alumínio (seção 5.2.1), CTAC 0,1% v/v foi utilizado para evitar a formação de resíduos carbonáceos. Uma amostra de leite integral diluída 1:1 e fortificada com 30 μg L^{-1} de Cr foi utilizada nas etapas de otimização, pois nos estudos iniciais, utilizando o programa de aquecimento recomendado pelo fabricante, o sinal analítico obtido não era satisfatório.

Inicialmente, um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} foi realizado com o objetivo de investigar a influência das principais variáveis envolvidas no processo de determinação do cromo por GFAAS: temperaturas de pirólise e de atomização e tempo de duração da pirólise (tabela 5.14). Com base nos resultados obtidos, foi realizado um planejamento composto central (CCD) utilizando as variáveis significativas (tabela 5.15). Para efetuar os cálculos foi utilizado o programa Statistica 6.1 (Statsoft).

Tabela 5.13 Programa de aquecimento usado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Fluxo de Argônio (mL min^{-1})
Secagem (CTAC)	90	5	5	250
Secagem	90	5	60	250
Pirólise	[a]	10	[c]	250
Atomização	[b]	0	5	0 (leitura)
Limpeza	2700	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

[a,b,c]Variáveis otimizadas.

Tabela 5.14 Níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} empregado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS.

Variável	Nível inferior (-1)	Nível Superior (+1)
Temperatura de pirólise (^oC)	1300	1900
Temperatura de atomização (^oC)	2000	2600
Tempo de duração da pirólise (s)	30	50

Tabela 5.15. Níveis estudados no CCD empregado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS.

Variável	Níveis Avaliados[d]
TP[a] (^oC)	1095 ($-\sqrt{3}$),1300 (-1), 1600 (0), 1900 (+1), 2105 ($\sqrt{3}$)
TA[b] (^oC)	1795 ($-\sqrt{3}$,) 2000 (-1), 2300 (0), 2600 (+1), 2805 ($\sqrt{3}$)
t[c] (s)	6 ($-\sqrt{3}$), 20 (-1), 40 (0), 60 (+1), 74 ($\sqrt{3}$)

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Tempo de pirólise. [d] Os valores entre parênteses correspondem ao valor codificado.

5.3.2. Parâmetros de mérito

As características de desempenho do método foram determinadas de forma semelhante ao descrito na seção 1.4.

Para estudos do efeito de matriz, as amostras foram divididas em grupos de acordo com o tipo e para grupo se preparou uma amostra composta pela mistura de volumes iguais de cada amostra pertencente ao grupo.

- Grupo 1: amostras de leite integral em pó, total de 5 amostras (amostra composta A1)
- Grupo 2: amostras de leite desnatado em pó, fórmulas infantis e enriquecidas, total de 5 amostras (amostra composta A2)
- Grupo 3: amostras de bebida láctea em pó, total de 2 amostras (amostra composta A3)
- Grupo 4: amostras de leite desnatado líquido, total de 7 amostras (amostra composta A4)
- Grupo 5: amostra de alimento de soja em pó, total de 1 amostra (amostra composta A5)
- Grupo 6: amostras de alimento de soja líquido, total de 2 amostras (amostra composta A6).

A partir daí foram construídas curvas de calibração aquosas (de 0 a 50 $\mu g\ L^{-1}$) e curvas de calibração por adição de analito (de 0 a 50 $\mu g\ L^{-1}$) com cada amostra composta para verificar o desempenho do método otimizado e também estudar os efeitos de matriz.

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de correlação linear (*r*). Para determinação da massa característica, mediu-se a área do pico correspondente à injeção de 20 μL de soluções aquosas de Cr 10 a 50 $\mu g\ L^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo a IUPAC (n=10 e parâmetros da curva aquosa). A precisão (repetitividade) foi avaliada com 8 replicatas de soluções em 3 concentrações distintas: 5, 10 e 20 $\mu g\ L^{-1}$. A exatidão foi checada pela análise do

material de referência certificado SRM 8435 (NIST). Seu preparo consistiu da solubilização em água deionizada e análise contra a curva aquosa.

5.3.3. Resultados e discussão

5.3.3.1 Otimização das condições experimentais

Para verificar e evitar efeitos de memória, causados pela permanência de analito dentro do tubo de grafite entre uma leitura e outra, foram realizadas leituras de brancos entre as leituras de amostras, durante a otimização.

Três modificadores permanentes apresentaram resultados satisfatórios no estudo realizado: W, Rh e Ru (figuras 5.5, 5.6 e 5.7, respectivamente). Como Rh apresentou maior sensibilidade e a absorção de fundo não foi muita alta, este modificador foi escolhido para os estudos posteriores. Comparativamente, Pereira e colaboradores (2004) utilizaram Rh como modificador permanente na determinação de Cr em águas de abastecimento usando Rh como modificador.

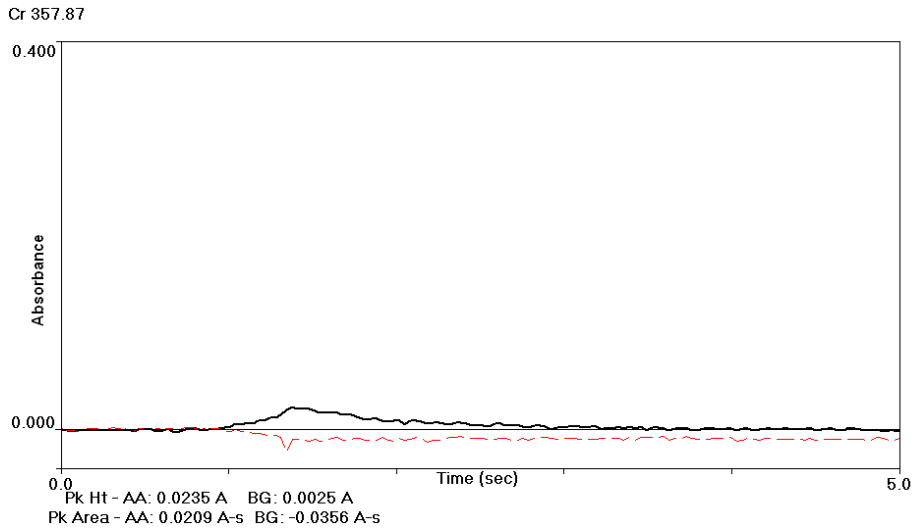

Figura 5.5. Perfil do pico obtido usando W como modificador permanente, nas condições recomendadas (TP = 1650º C e TA = 2500°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1 fortificada com 30 μg L^{-1} de Cr.

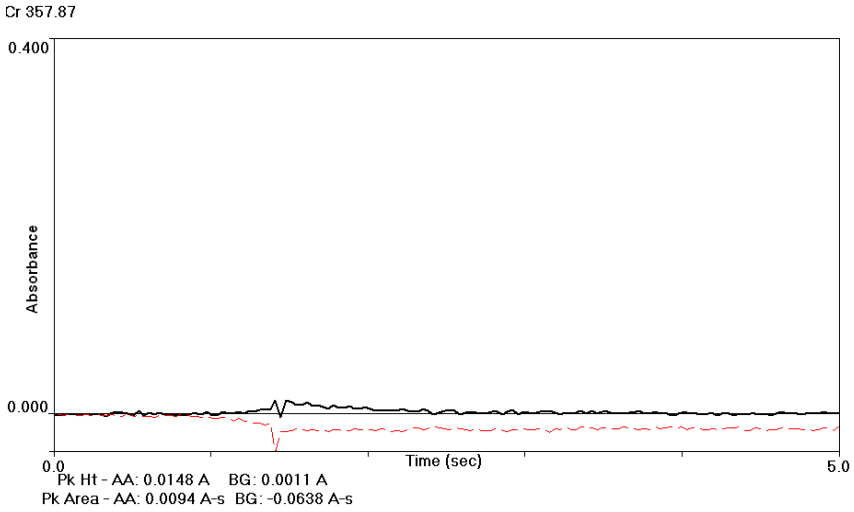

Figura 5.6. Perfil do pico obtido usando Ru como modificador permanente, nas condições recomendadas (TP = 1650º C e TA = 2500°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1 fortificada com 30 μg L^{-1} de Cr.

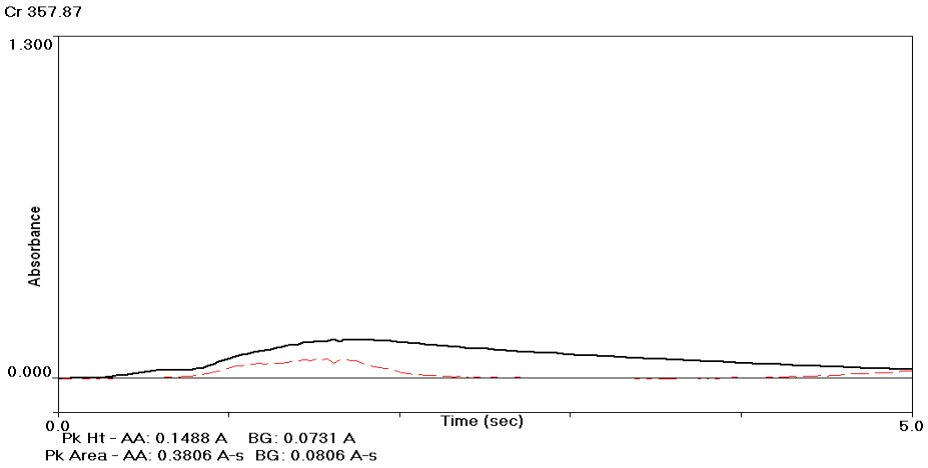

Figura 5.7. Perfil do pico obtido usando Rh como modificador permanente, nas condições recomendadas (TP = 1650º C e TA = 2500°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1 fortificada com 30 μg L^{-1} de Cr.

Os resultados do planejamento fatorial fracionário podem ser visualizados na tabela 5.16. Analisando o gráfico de Pareto (figura 5.8) podemos verificar que todas as variáveis foram significativas para um nível de confiança de 95%.

Tabela 5.16. Resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário empregado na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS.

Ensaio	TP[a,d] (°C)	TA[b,d] (°C)	Tempo[c,d] (s)	Absorvância integrada (A s^{-1}) média ± desvio padrão (n=3)
1	1300 (-1)	2000 (-1)	50 (+1)	0,260 ± 0,026
2	1300 (-1)	2600 (+1)	30 (-1)	0,283 ±0,010
3	1900 (+1)	2000 (-1)	30 (-1)	0,018 ±0,002
4	1900 (+1)	2600 (+1)	50 (+1)	0,080 ±0,006

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Tempo de pirólise. [d] Os valores entre parênteses correspondem ao valor codificado.

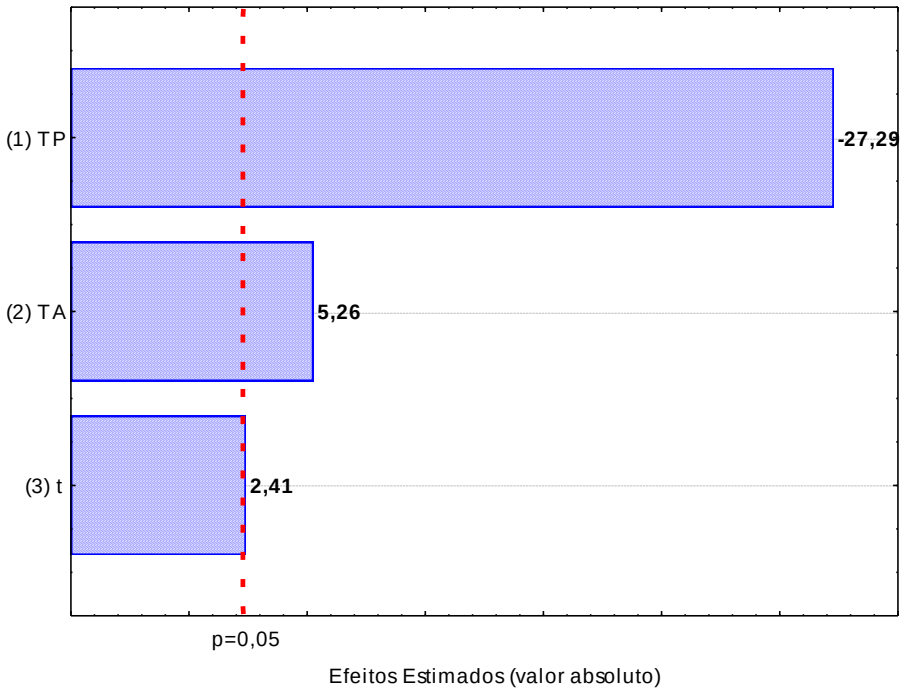

Figura 5.8. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário (TP: temperatura de pirólise; TA: temperatura de atomização; t: tempo de pirólise) na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS

Os efeitos individuais destas variáveis foram positivos para tempo e temperatura de atomização, sugerindo um aumento nos valores destas variáveis para obtenção de máximo de resposta (absorvância integrada), ao contrário da temperatura de pirólise, que apresentou efeito significativo negativo, sugerindo uma diminuição de TP para se alcançar o máximo de resposta.

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário, foi realizado um planejamento composto central (CCD) para verificação das condições ótimas para determinação de Cr em leites e similares (tabela 5.15). Os resultados obtidos pelo CCD podem ser visualizados na tabela 5.17. Analisando o gráfico de Pareto obtido pelo CCD, podemos verificar que todas as variáveis foram significativas para um nível de confiança de 95%, bem como as interações entre elas (figura 5.9). As variáveis TP e t tiveram efeito significativo negativo, sugerindo maior resposta quando se avalia os níveis inferiores de TP e t, ao contrário de TA, que apresentou efeito significativo e positivo, sugerindo aumento de TA pra obtenção de maior resposta. A interação entre TP e TA apresentou efeito significativo e positivo, sugerindo que um aumento de resposta quando se trabalha simultaneamente no nível mais baixo de TP e mais alto de TA. Existe efeito significativo negativo nas interações t e TP entre t e TA, enquanto a interação quadrática de t apresentou efeito significativo positivo. A existência destes efeitos significativos de segunda ordem implica em uma elevada relação entre as variáveis, o que explica o melhor ajuste do modelo quadrático aos dados avaliados, com 89,809% de variação explicada pelo modelo.

O modelo quadrático obtido do CCD foi expresso de acordo com

$$A = 7{,}8894 + (3{,}3163 \times 10^{-3})\,(TP) - (1{,}4166 \times 10^{-6})\,(TP)^2 + (4{,}8945 \times 10^{-3})\,(TA) - 1{,}02285 \times 10^{-6})\,(TA)^2 + (4{,}1597 \times 10^{-7})\,(TP)\,(TA) - (1{,}432291 \times 10^{-3})\,(TP)(t) - (5{,}552083 \times 10^{-6})\,(TA)\,(t) \quad \text{(equação 6)}$$

onde A é a resposta absorvância integrada, TP é a temperatura de pirólise, TA é a temperatura de atomização e t é o tempo de pirólise.

Tabela 5.17 Resultados obtidos no planejamento composto central na otimização do método para determinação de Cr em leite e alimentos similares por GFAAS.

Ensaio	TP[a,d] (°C)	TA[b,d] (°C)	Tempo[c,d] (s)	Abs. Integrada (A s^{-1}) média ± desvio padrão (n=2)
1	1095 ($-\sqrt{3}$)	2300 (0),	40 (0)	0,860 ± 0,023
2	1300 (-1)	2000 (-1)	20 (-1)	0,760 ± 0,007
3	1300 (-1),	2000 (-1)	60 (+1)	0,731 ± 0,028
4	1300 (-1),	2600 (+1)	20 (-1)	0,929 ± 0,006
5	1300 (-1),	2600 (+1)	60 (+1)	0,923 ± 0,012
6	1600 (0)	1795 ($-\sqrt{3}$)	40 (0)	0,062 ± 0,083
7	1600 (0)	2300 (0)	6 ($-\sqrt{3}$)	1,146 ± 0,198
8 (PC)[e]	1600 (0)	2300 (0)	40 (0)	0,776 ± 0,017 [e]
9	1600 (0)	2300 (0)	74 ($\sqrt{3}$)	0,657 ± 0,000
10	1600 (0)	2805 ($\sqrt{3}$)	40 (0)	0,997 ± 0,030
11	1900 (+1)	2000 (-1)	20 (-1)	0,287 ± 0,001
12	1900 (+1)	2000 (-1)	60 (+1)	0,071 ± 0,009
13	1900 (+1)	2600 (+1)	20 (-1)	0,762 ± 0,055
14	1900 (+1)	2600 (+1)	60 (+1)	0,256 ± 0,054
15	2105 ($\sqrt{3}$)	2300 (0),	40 (0)	-0,001 ± 0,004

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Tempo de pirólise. [d] Os valores entre parênteses correspondem ao valor codificado. [e] Foram realizadas cinco replicatas no ponto central (PC).

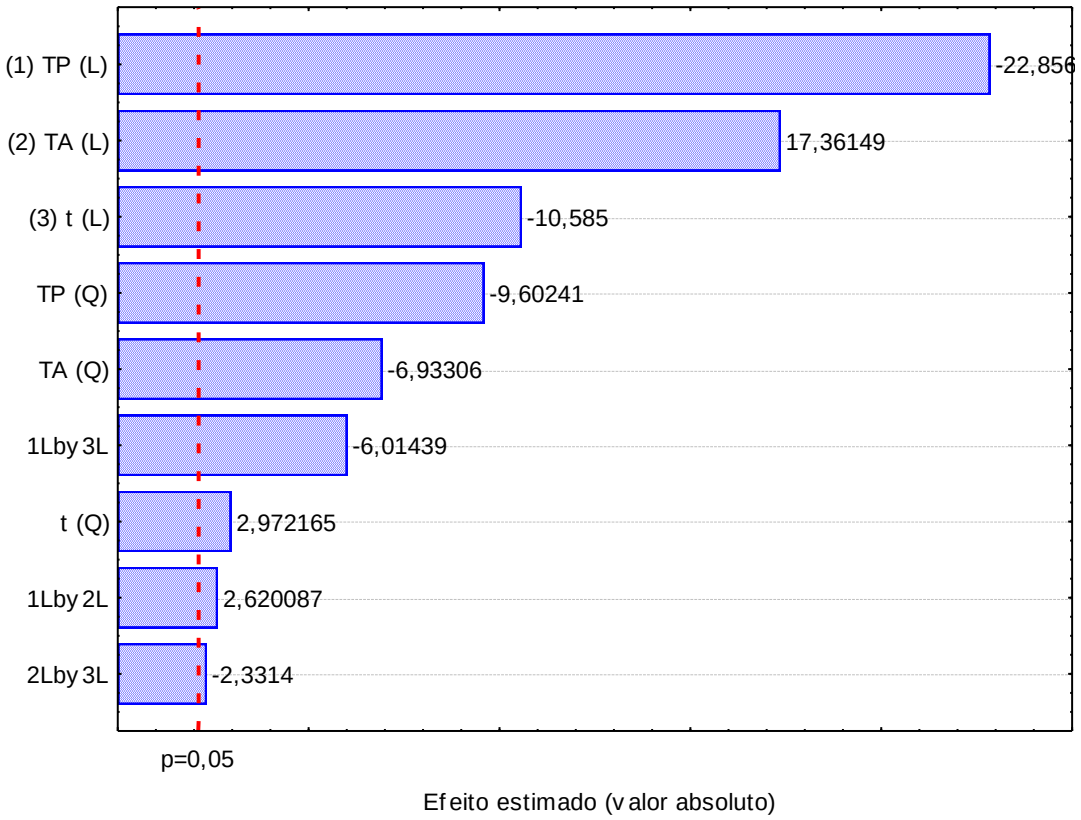

Figura 5.9. Gráfico de Pareto obtido pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS, mostrando os efeitos estimados das variáveis: TP, temperatura de pirólise; TA, temperatura de atomização; t, tempo de pirólise, Q, interação quadrática, L, interação linear.

O ponto crítico foi calculado das derivadas parciais [$\delta A/\delta(TP)$] = 1277 ^{o}C, [$\delta A/\delta(TA)$]= 2512 ^{o}C e [$\delta A/\delta(t)$]= 52 s, correspondendo à região de maior sensibilidade. Os pontos máximos, mínimos e críticos são apresentados na tabela 5.18. Como todas as variáveis foram significativas, para visualização das superfícies de resposta, foi necessário fixar uma das variáveis e com isso obteve-se dois gráficos (figuras 5.10 e 5.11). Pela figura 5.12, pode-se verificar que na condição ótima, a absorção de fundo foi adequadamente corrigida.

Tabela 5.18 Pontos observados pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leites e similares por GFAAS.

Parâmetros	Mínimo Observado	Ponto Crítico	Máximo Observado
Temperatura de pirólise (^{o}C)	1095	1277	2105
Temperatura de atomização (^{o}C)	1795	2512	2805
Tempo de pirólise (s)	6	52	74

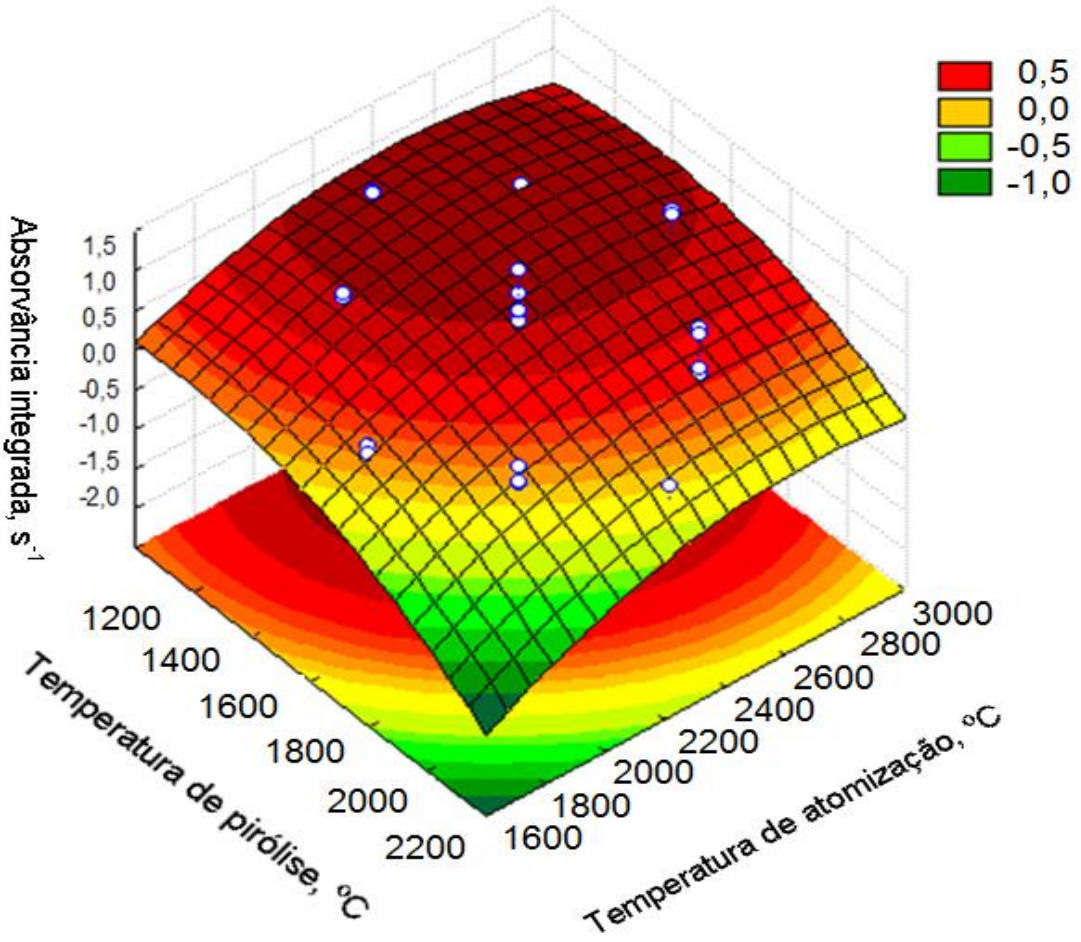

Figura 5.10. Superfície de resposta e seus contornos obtidos pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS, fixando o tempo de pirólise em 52s.

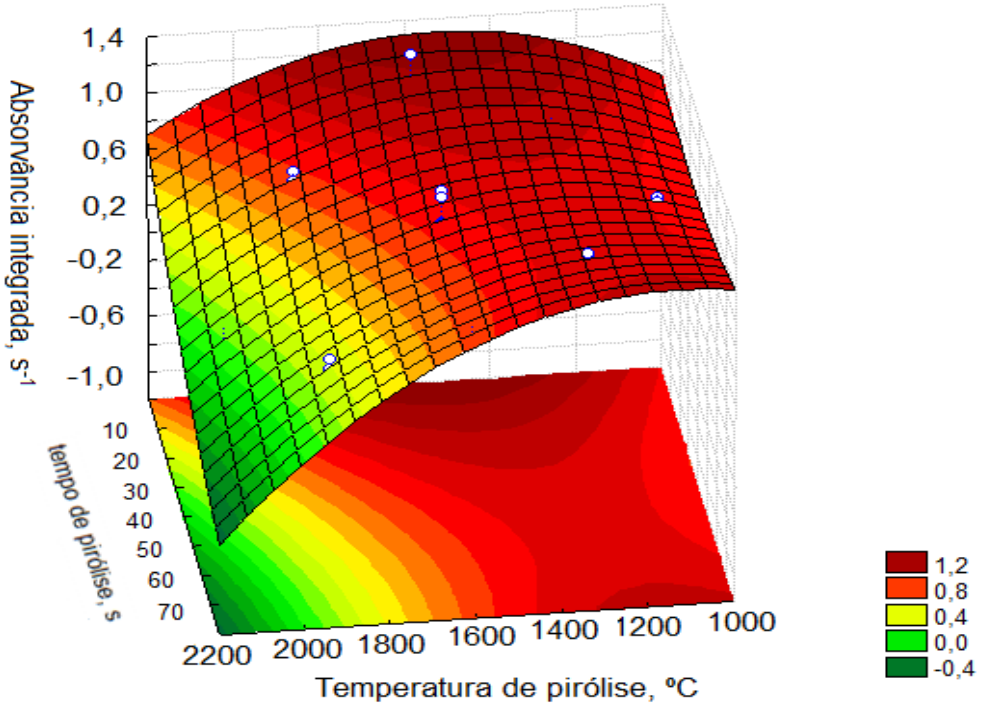

Figura 5.11 Superfície de resposta e seus contornos obtidos pelo CCD na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS, fixando a temperatura de atomização em 2512°C.

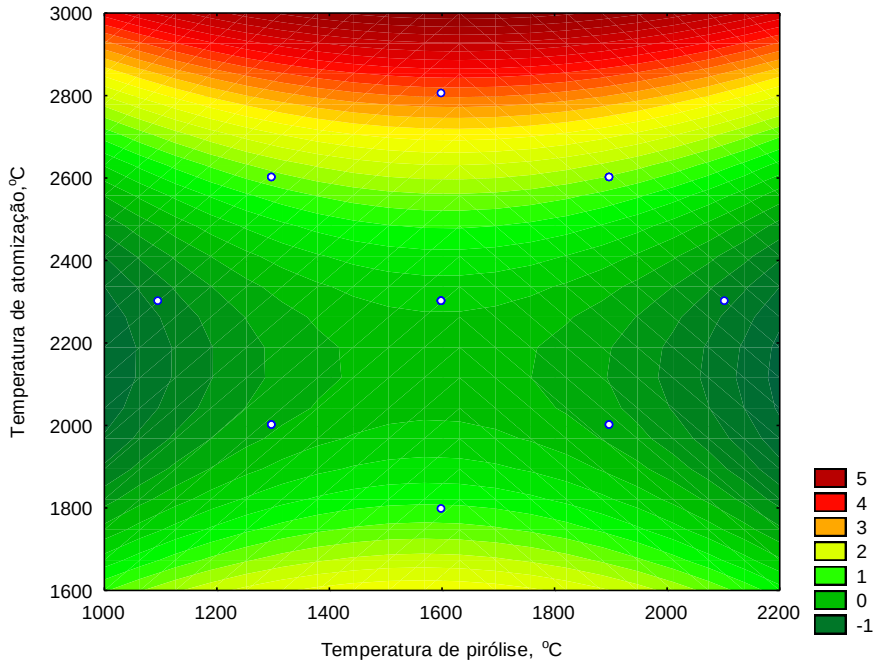

Figura 5.12 Gráfico de contorno da superfície de resposta do módulo da absorção de fundo, obtido na otimização do método para determinação de Cr em leite e similares por GFAAS, fixando o tempo de pirólise em 52s.

Sendo assim, as condições experimentais ótimas para a determinação de cromo em leites e similares foram estabelecidas: Rh como modificador permanente; temperatura de pirólise: 1280 ^{o}C; temperatura de atomização: 2510 ^{o}C; tempo de pirólise: 52 s. Em condições univariadas, Pereira e colaboradores (2004) encontraram valores de 1000º e 2000ºC para temperatura de pirólise e atomização, respectivamente, na determinação de Cr em águas de abastecimento usando Rh como modificador.

5.3.3.2 Parâmetros de mérito

Com o método otimizado, foram então determinadas as características de desempenho do método, conforme descrito na seção 1.4. Os resultados obtidos no estudo do efeito de matriz podem ser visualizados na tabela 5.19. As amostras foram agrupadas por similaridade e amostras compostas foram preparadas para este estudo.

Tabela 5.19 Resultados da calibração através das curvas de adição de analito para as amostras compostas e curvas aquosas na avaliação do efeito de matriz na determinação de Cr em leite e similares pelo método otimizado.

Curvas de adição			Curvas aquosas [a]	
Amostra	Inclinação e desvio obtido pela regressão	*r*	Inclinação e desvio obtido pela regressão	*r*
A1	0,0204 ± 0,0013	0,9960	0,0182 ± 0,0002	0,9993
A2	0,0175 ± 0,0001	1,0000	0,0182 ± 0,0002	0,9993
A3	0,0215 ± 0,0024	0,9993	0,0182 ± 0,0002	0,9993
A4	0,0177 ± 0,0012	0,9951	0,0182 ± 0,0002	0,9993
A6	0,0166 ± 0,0006	0,9985	0,0158 ± 0,0005	0,9987
A7	0,0169 ± 0,0004	0,9995	0,0156 ± 0,0002	0,9993

[a] Curvas aquosas obtidas em condições de repetitividade em relação à curva de adição de analito correspondente.

Curvas de calibração aquosas e pelo método das adições foram obtidas usando cinco níveis de concentração com valores de r > 0,9900.

Comparando as inclinações das curvas realizadas em condições de repetitividade, verifica-se que as inclinações das curvas de adição de A1, A2, A4, A5 e A6 são estatisticamente semelhantes à inclinação da curva aquosa (nível de confiança de 95%). Isso sugere uma calibração aquosa para determinação de Cr nas amostras de leite integral, leite desnatado, fórmulas infantis e enriquecidas em pó, leite desnatado líquido e nas amostras de alimento de soja em pó e líquido, visto que não há efeito de matriz sobre o sinal do analito. No caso dos outros tipos de matriz, a calibração deve se processar pelo método de adição padrão.

Os demais parâmetros analíticos de mérito foram obtidos baseados na calibração aquosa (Tabela 5.20).

Tabela 5.20 Características de desempenho do método otimizado para a determinação de Cr em leites e similares por GFAAS.

Parâmetros	Resultados[e]
Faixa de trabalho linear ($\mu g\ L^{-1}$)	5,0 a 50,00
Limite de detecção, LD ($\mu g\ L^{-1}$)	(1,43 ± 0,09)
Limite de detecção, LD ($\mu g\ kg^{-1}$)	(28,6 ± 1,8)
Limite de quantificação, LQ ($\mu g\ L^{-1}$)	(5,0 ± 0,3)
Limite de quantificação, LQ ($\mu g\ kg^{-1}$)	(95,6 ± 5,8)
Precisão, DPR[a] (%),	1,5 a 11,8
Exatidão[b] (SRM 8435, $\mu g\ g^{-1}$)	(0,461 ± 0,035)
Recuperação (%)[d]	82,6 a 96,8
Massa característica (pg)[c]	(4,5 ± 0,4)

[a] 8 amostras, níveis de concentração 5, 10 e 20 $\mu g\ L^{-1}$. [b] Valor informado: 0,5 $\mu g\ g^{-1}$.
[c] Massa característica recomendada: 3 pg.
[d] Níveis de concentração 10, 20 e 30 $\mu g\ L^{-1}$.
[e] Os valores entre parênteses referem-se à média ± desvio padrão.

A faixa de trabalho linear foi estabelecida entre o limite de quantificação e o último ponto da curva de calibração. O limite de detecção (1,43 ± 0,09 μg L^{-1}) e o limite de quantificação (5,0 ± 0,3 μg L^{-1}) foram calculados pelo critério IUPAC. A sensibilidade foi avaliada calculando a massa característica, que foi de (4,5 ± 0,4 pg) e comparando com o valor recomendado (3 pg) e foi considerada adequada. Esse valor de massa característica ligeiramente superior permitiu o alcance de uma faixa de trabalho mais ampla (até 50,0 μg L^{-1}). Comparativamente, Quinaia e Nóbrega (2000) determinaram Cr em leite por GFAAS obtendo massa característica de 7,8 pg.

Os desvios padrão relativos obtidos para três concentrações distintas apresentaram-se dentro dos valores aceitáveis para precisão, não ultrapassando 11,8%. A concentração de Cr no material de referência certificado utilizado era apenas informado, entretanto o valor obtido foi muito próximo do valor informado indicando que a exatidão do método é adequada.

5.3.3.3 Aplicação do método

O método otimizado foi aplicado na determinação de Cr em 17 amostras obtidas no comércio local (seção 3.1.3). Os resultados da análise de leite e similares são mostrados na tabela 5.21. Para as amostras analisadas, as concentrações de Cr apresentaram-se na faixa de 0,042 a 1,900 μg g^{-1} , sendo 0,092 a 0,449 μg g^{-1} (n = 3) para leite integral, 0,098 μg g^{-1} para bebida láctea (n = 1), 0,042 a 0,191 μg g^{-1} para leite desnatado e 0,047 a 0,131 μg g^{-1} para fórmula infantil (n = 7); 0,140 μg g^{-1} e 0,154 μg g^{-1} para alimento com soja e fórmula infantil de soja (n = 2) e 1,15 a 1,90 μg g^{-1} para leite de cabra (n= 2). Os teores de Cr foram superiores nas amostras de leite de cabra em pó e inferiores em uma amostra de leite desnatado. Comparativamente, Guler (2007) encontrou concentração de 0,77 ± 0,08 μg g^{-1} (base seca) de Cr em uma amostra de leite de cabra cru por ICP OES após digestão por micro-ondas e Saracoglu e colaboradores (2007) encontraram concentrações de Cr na faixa de 2,02 a 68,8 μg kg^{-1} em 19 amostras de fórmula infantil por GFAAS após digestão por micro-ondas.

Tabela 5.21 Concentrações de cromo em leite e alimentos infantis similares determinadas pelo método proposto.

Amostras	Concentração[a] ($\mu g\ g^{-1}$)
Bebida láctea M3	0,098 ± 0,010
Leite integral IE1	0,449 ± 0,076
Leite integral I5	0,105 ± 0,013
Leite integral I6	0,092 ± 0,004
Leite desnatado D2	0,191 ± 0,015
Leite desnatado D1	0,042 ± 0,006
Fórmula infantil F1	0,047 ± 0,021
Fórmula infantil F2	0,064 ± 0,004
Fórmula infantil DE1	0,076 ± 0,017
Fórmula infantil DE2	0,131 ± 0,054
Fórmula infantil F5	0,114 ± 0,006
Fórmula infantil F6	0,101 ± 0,008
Fórmula infantil F8	0,110 ± 0,010
Fórmula infantil de soja FS2	0,140 ± 0,007
Alimento com soja S1	0,154 ± 0,018
Leite de cabra C1	1,900 ± 0,600
Letie de cabra C2	1,150 ± 0,120

[a] Média ± desvio padrão (n=3).

As recomendações para a ingestão são 35 $\mu g\ dia^{-1}$ para adultos, 0,2 $\mu g\ dia^{-1}$ para crianças de 0 a 6 meses e 5,5 $\mu g\ dia^{-1}$ para idades de 6 a 12 meses, 11 $\mu g\ dia^{-1}$ para crianças com idade entre 1 e 3 anos e 15 $\mu g\ dia^{-1}$ para crianças entre 4 e 10 anos (ANVISA, 2005). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (U.S. *Environmental Protection Agency* , EPA), o teor máximo de cromo total permitido em água para consumo é de 100 $\mu g\ L^{-1}$ e teores de até 1400 $\mu g\ L^{-1}$ por 10 dias de

exposição para crianças, 240 μg L^{-1} por períodos mais longos para crianças, 840 μg L^{-1} por períodos mais longos para adultos e 120 μg L^{-1} por toda a vida para adultos são considerados fora dos níveis tóxicos (U.S. EPA, 2009).

O conteúdo de Cr foi maior nas amostras de leite de cabra. Considerando o teor encontrado nestas amostras e uma mamadeira de 200 mL, após a reconstituição segundo as recomendações do fabricante (15% m/v), a quantidade de Cr presente seria de 57 e 35 μg, respectivamente para as amostras C1 e C2. Estes valores ultrapassam o limite estabelecido pela ANVISA para qualquer faixa etária. Além disso, uma amostra de leite integral enriquecida também apresentou concentração de Cr mais elevada, o que corresponderia a uma ingestão de 13,5 μg de Cr em 200 mL do alimento reconstituído e portanto não é indicado para crianças menores de 3 anos. As demais amostras apresentariam concentração de 1,9 a 5,7 μg em 200 mL do alimento.

5.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS

5.4.1 Otimização das condições analíticas

Foram realizadas várias medidas de absorvância integrada e sinal de fundo nas condições recomendadas pelo fabricante de 20 μL de amostra de leite integral diluída 1:1 com água deionizada, em presença de W, Rh, Ir e Ru como modificadores químicos permanentes e também na ausência de modificadores

A etapa de secagem foi otimizada como descrito na seção 5.2.1. O programa de temperatura utilizado na otimização é mostrado na tabela 5.22. Como descrito anteriormente (seção 5.2.1), CTAC 0,1% v/v foi utilizado para evitar a formação de resíduos carbonáceos. Uma amostra de leite integral diluída 1:1 (sem adição de Mn) foi utilizada nas etapas de otimização.

Um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} foi realizado com o objetivo de investigar a influência das variáveis envolvidas no processo de determinação do Mn:

temperaturas de pirólise e de atomização e tempo de pirólise (tabela 5.23). Baseando-se nos resultados obtidos, foi realizado um planejamento composto central (CCD) utilizando as variáveis significativas (tabela 5.24). Para efetuar os cálculos foi utilizado o programa Statistica 6.1 (Statsoft).

Tabela 5.22 Programa de temperatura usado na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Fluxo de argônio (mL min^{-1})
Secagem	90	5	5	250
Secagem	90	5	60	250
Pirólise	[a]	10	[c]	250
Atomização	[b]	0	5	0 (leitura)
Limpeza	2700	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

[a,b,c]Variáveis otimizadas.

Tabela 5.23 Níveis estudados no planejamento fatorial fracionário para otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS

Variável	Nível inferior (-1)	Nível Superior (+1)
Temperatura de pirólise (^oC)	1000	1800
Temperatura de atomização (^oC)	2000	2600
Tempo de duração da pirólise (s)	20	60

Tabela 5.24 Níveis estudados no CCD para otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS.

Fatores	Níveis Avaliados[c]
TP[a] (^{o}C)	876 ($-\sqrt{2}$), 1000 (-1), 1300 (0), 1600 (+1), 1724 ($\sqrt{2}$)
TA[b] (^{o}C)	1876 ($-\sqrt{2}$,) 2000 (-1), 2300 (0), 2600 (+1), 2724 ($\sqrt{2}$)

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Os valores entre parênteses referem-se aos valores codificados.

5.4.2. Parâmetros de mérito

As características de desempenho do método foram determinadas de forma semelhante ao descrito na seção 1.4.

Para estudos do efeito de matriz, as amostras foram divididas em grupos e para cada grupo um amostra composta foi preparada. Os grupos foram:

- Grupo 1: amostras de leite integral (5 amostras), amostra composta A1
- Grupo 2: amostras de leite desnatado, fórmulas infantis e enriquecidas (5 amostras), amostra composta A2
- Grupo 3: amostras de bebida láctea (2 amostras), amostra composta A3
- Grupo 4: amostra de alimento de soja (3 amostras), amostra composta A4
- Grupo 5: amostras de leite de cabra integral (2 amostras), amostra composta A5.

A partir daí foram construídas curvas de calibração aquosas (de 0 a 20 μg L^{-1}) e curvas de adição de analito (de 0 a 20 μg L^{-1}) com cada amostra composta para verificar o desempenho do método otimizado e também estudar os efeitos de matriz.

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de correlação linear. Para determinação da massa característica, mediu-se a área do pico correspondente a injeções de 20 μL de soluções aquosas de Mn 5,0 a 20,0 μg L^{-1}. Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo a IUPAC (n=10 e parâmetros da curva aquosa). A precisão (repetitividade) foi avaliada com 3 replicatas de soluções em 3 concentrações distintas: 5, 10 e 20 μg L^{-1}. A exatidão foi checada pela análise dos

materiais de referência certificados SRM 8435 e SRM 1549 (NIST). O preparo destes materiais consistiu da solubilização em água deionizada e análise contra a curva aquosa.

5.4.3 Resultados e discussão

5.4.3.1 Otimização das condições experimentais

O uso de Ir permanente como modificador e também a condição sem modificador apresentaram como resultados picos mais simétricos e com menor absorção de fundo. Maior sensibilidade foi obtida com o uso de Ir permanente, que foi, portanto, selecionado para as etapas posteriores (figuras 5.13 e 5.14).

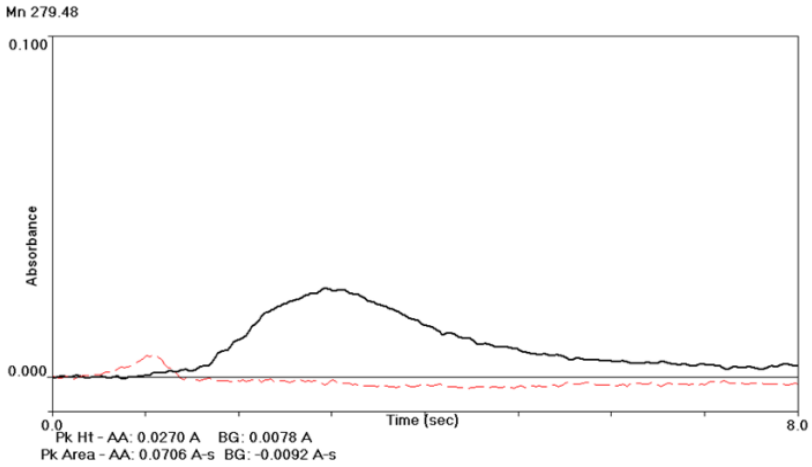

Figura 5.13 Perfil do pico obtido para Mn sem modificador, nas condições recomendadas (TP = 1300º C e TA = 2300°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1.

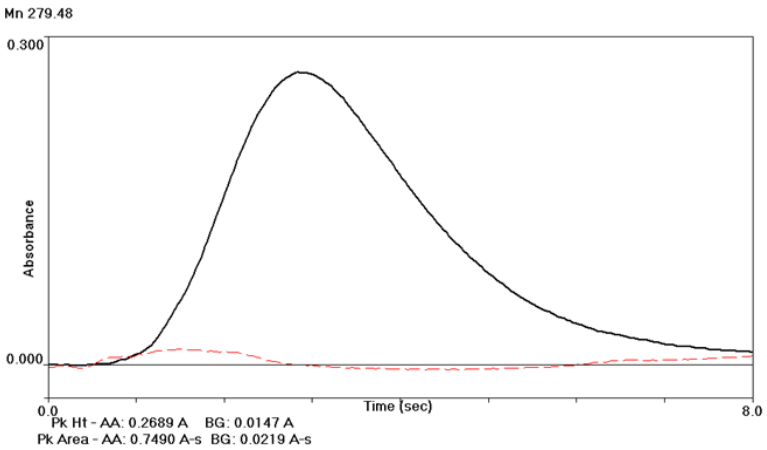

Figura 5.14 Perfil do pico obtido para Mn usando Ir como modificador, nas condições recomendadas (TP = 1300º C e TA = 2300°C), para uma amostra de leite integral diluída 1:1.

Comparativamente, Fuente e colaboradores (1995) utilizaram $Mg(NO_3)_2$ como modificador na determinação de Mn em leite digerido em sistema micro-ondas.

Os resultados do planejamento fracionário podem ser visualizados na tabela 5.25. Analisando o gráfico de Pareto (figura 5.15) podemos verificar que somente as variáveis temperatura de pirólise e de atomização foram significativas para um nível de confiança de 95%. Isto significa que somente estas variáveis dentre as estudadas apresentam efeito significativo sobre a resposta (absorvância integrada). Os efeitos individuais destas variáveis foram positivos para temperatura de atomização, sugerindo um aumento nos valores destas variáveis para obtenção de máximo de resposta ($A\ s^{-1}$), e negativo para temperatura de pirólise, sugerindo uma diminuição de TP para se alcançar o máximo de resposta.

Tabela 5.25 Resultados do planejamento fatorial fracionário empregado na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS.

	Replicata	TP[a] (°C)	TA[b] (°C)	tempo[c] (s)	Absorbância Integrada (s)
1	1	1000	2000	60	0,466
2	1	1800	2000	20	0,031
3	1	1000	2600	20	0,816
4	1	1800	2600	60	0,208
5	2	1000	2000	60	0,474
6	2	1800	2000	20	0,034
7	2	1000	2600	20	0,693
8	2	1800	2600	60	0,240

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Tempo de pirólise.

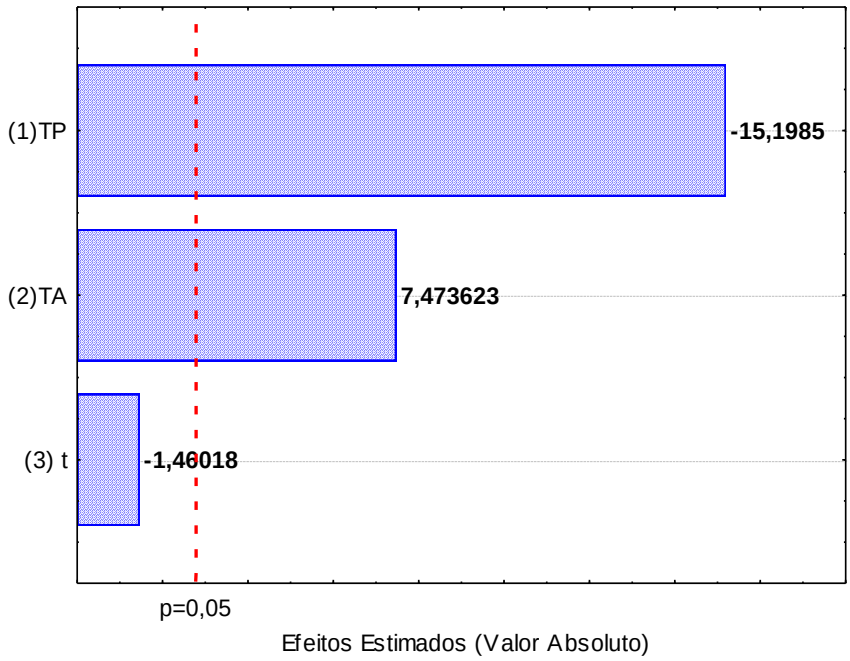

Figura 5.15 Gráfico de Pareto obtido na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS, mostrando os efeitos das variáveis: temperatura de pirólise (TP), temperatura de atomização (TA), e, tempo de duração da etapa de pirólise.

Após este estudo, um planejamento CCD foi construído com as variáveis significativas para determinar as condições ótimas e os pontos críticos dessas variáveis. Os resultados do CCD podem ser visualizados na tabela 5.26. Uma avaliação dos efeitos destas variáveis sobre a resposta e suas interações foi realizada partindo destes resultados (figura 5.16). As temperaturas de pirólise e atomização e a interação quadrática da temperatura de pirólise apresentaram efeitos significativos. Um modelo quadrático foi obtido após testes de ajuste através da análise de variância (ANOVA). A equação polinomial ajustada foi expressa como gráficos de superfície e contorno com a finalidade de visualização do comportamento do sistema e da região dos pontos críticos (figura 5.17 e 5.18).

Tabela 5.26 Resultados obtidos no CCD empregado na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS.

Ensaio	TP [a,c] (^{o}C)	TA[b,c] (^{o}C)	Abs. integrada Média ± s[d] (A s^{-1})	Sinal de fundo Média± s[d] (A s^{-1})
1	1000 (-1)	2000 (-1)	0,478 ± 0,003	0,076 ± 0,005
2	1000 (-1)	2600 (+1)	0,618 ± 0,060	-0,085 ± 0,097
3	1600 (+1)	2000 (-1)	0,060 ± 0,004	-0,083 ± 0,007
4	1600 (+1)	2600 (+1)	0,202 ± 0,015	-0,233 ± 0,001
5	876 ($-\sqrt{2}$)	2300 (0)	0,441 ± 0,031	0,079 ± 0,027
6	1724 ($\sqrt{2}$)	2300 (0)	0,082 ± 0,001	-0,133 ± 0,032
7	1300 (0)	1876 ($-\sqrt{2}$)	0,434 ± 0,001	0,033 ± 0,040
8	1300 (0)	2724 ($\sqrt{2}$)	0,646 ± 0,039	-0,113 ± 0,068
9 (C)	1300 (0)	2300 (0)	0,443 ± 0,018	0,017 ± 0,082
10 (C)	1300 (0)	2300 (0)	0,424 ± 0,018	-0,045 ± 0,002

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Os valores entre parênteses referem-se aos valores codificados. [d] desvio padrão.

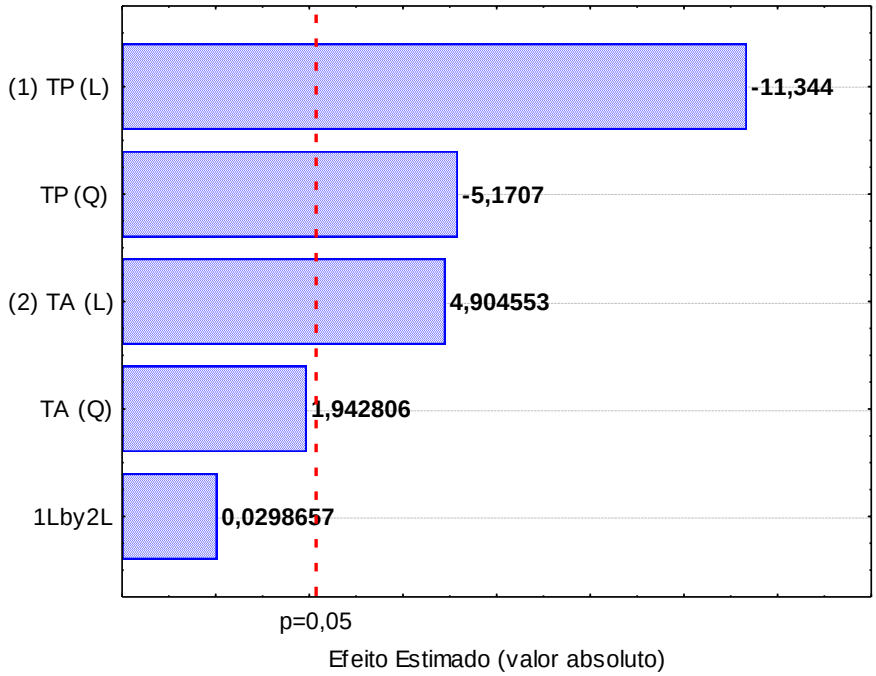

Figura 5.16 Gráfico de Pareto obtido pelo CCD na otimização do método para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS, mostrando os efeitos estimados das variáveis: temperatura de pirólise (TP), temperatura de atomização (TA), tempo de pirólise (t), interação quadrática (Q), interação linear (L).

O modelo quadrático foi expresso de acordo com

$$A = 0{,}959488 + (2{,}3486 \times 10^{-3})\,(TP) - (1{,}1247 \times 10^{-6})\,(TP)^2 - (1{,}7109 \times 10^{-3})\,(TA) + (4{,}2256 \times 10^{-7})\,(TA)^2 + (6{,}9444 \times 10^{-9})\,(TP)\,(TA) \quad \text{(equação 7)}$$

onde A é a absorvância integrada, TP é a temperatura de pirólise e TA é a temperatura de atomização. Observando a superfície de resposta, percebe-se que há somente um valor máximo para TP, sugerindo uma expansão do planejamento no sentido de investigar TA's acima de 2800^{o}C. A expansão do planejamento não foi realizada, pois o equipamento utilizado não trabalha com temperaturas mais elevadas. Com a análise da superfície de contorno (figura 5.18), é possível estabelecer as condições de maior sensibilidade para o método. De acordo com a figura 5.18, a maior sensibilidade é alcançada quando TP é cerca de 1000 ^{o}C e TA de 2800 ^{o}C. Como esta condição reduziria o tempo de uso do tubo de grafite, optou-se por usar TA de 2600 ^{o}C, sem comprometer a sensibilidade de modo significativo. Analisando a superfície de contorno do sinal de absorção de fundo (figura 5.19), confirmou-se que as

condições de TP de 1000 ^{o}C e TA de 2600 ^{o}C são adequadas, pois nestas condições o sinal de absorção de fundo é baixo e pode ser corrigido pela sistema de correção utilizado neste equipamento (lâmpada de deutério).

Sendo assim, as condições ótimas de determinação foram otimizadas: modificador permanente: Ir; temperatura de pirólise: 1000 ^{o}C; temperatura de atomização: 2600 ^{o}C; tempo de pirólise: 20 s. Para fins de comparação, foram construídas as curvas de temperatura de pirólise e de atomização TP e TA. A curva de TP foi obtida fixando-se TA em 2300ºC (condições recomendadas) e a curva de TA foi obtida fixando-se o valor de TP otimizado previamente pela mesma curva de TP (1400ºC).

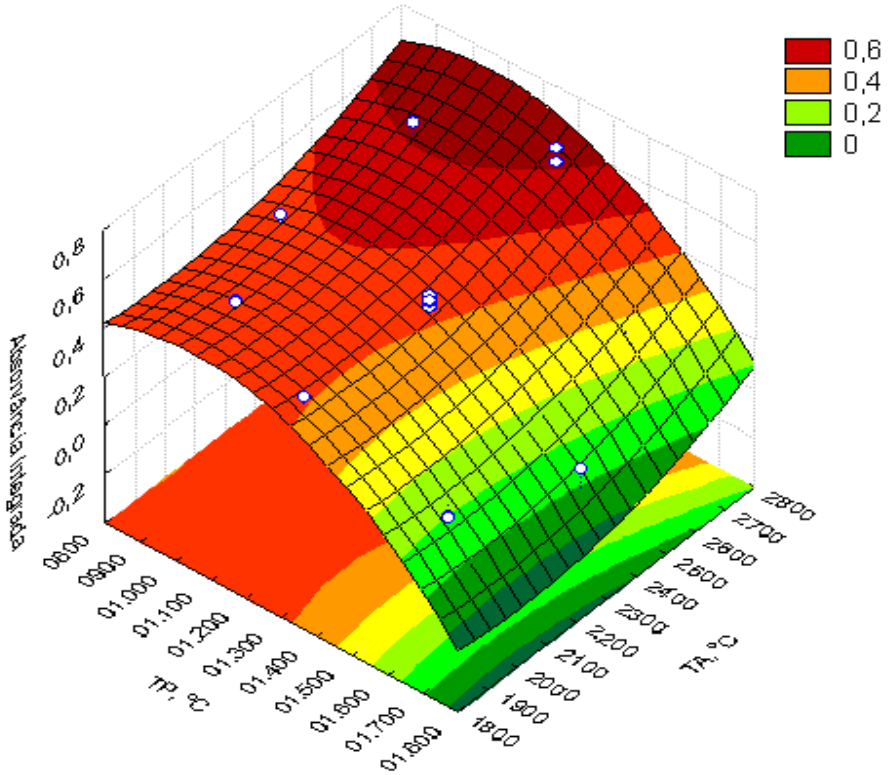

Figura 5.17 Superfície de resposta obtida do CCD para otimização das condições para determinação de Mn em leites e similares (TP, temperatura de pirólise; TA, temperatura de atomização).

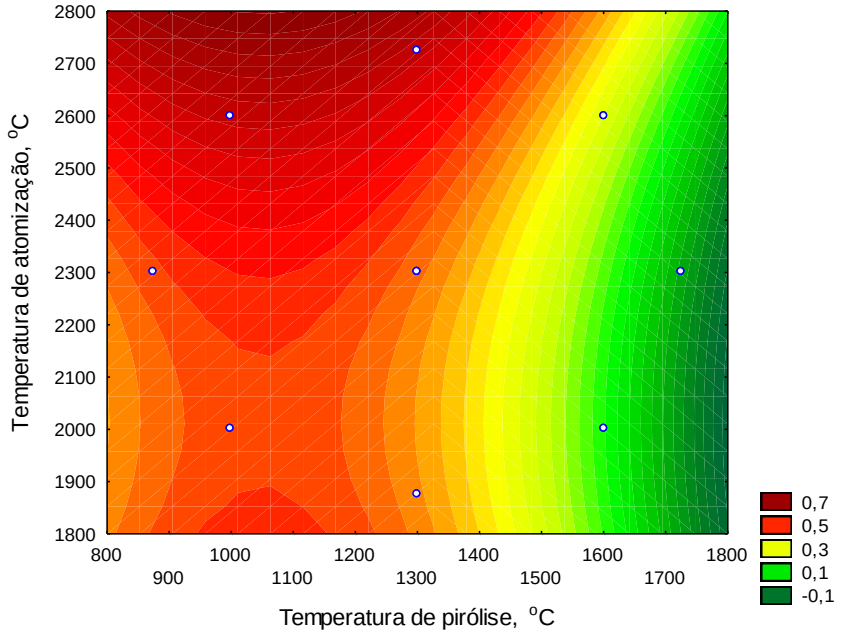

Figura 5.18 Gráfico de contorno da superfície de resposta obtida na otimização das condições para determinação de Mn em leites e similares

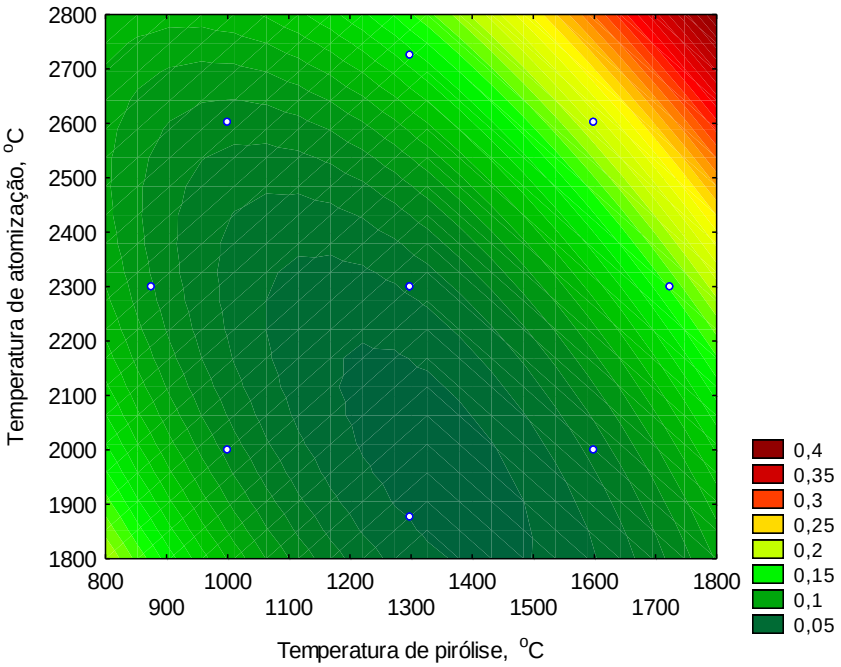

Figura 5.19 Gráfico de contorno da superfície de resposta módulo da absorção de fundo obtida na otimização das condições para determinação de Mn em leites e similares

Pela otimização univariada (construção de curvas de pirólise e de atomização), obteve-se TP = 1400°C e TA = 1800ºC (figura 5.20).

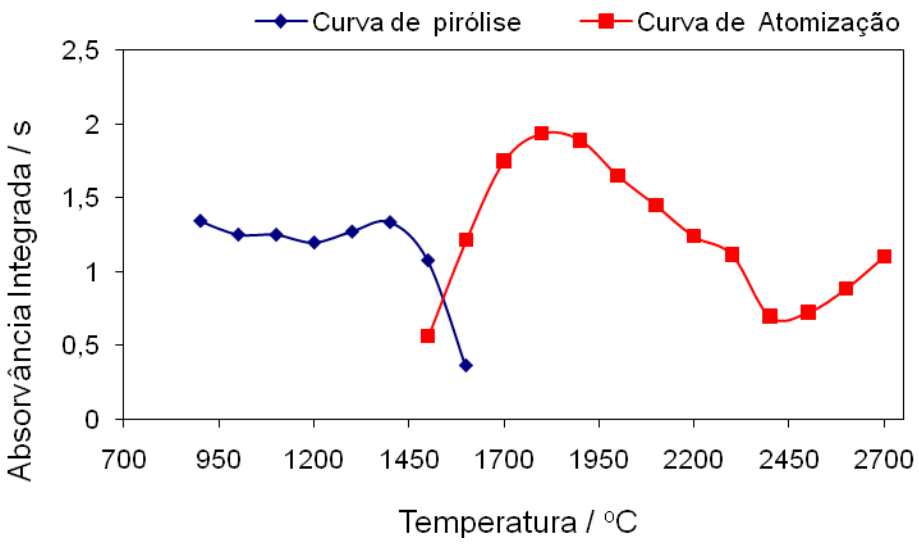

Figura 5.20 Curvas de pirólise e atomização obtidas univariadamente para Mn em leite usando Ir como modificador permanente.

Em condições univariadas, Fuente e colaboradores encontraram valores de 1300º e 2200ºC para temperatura de pirólise e atomização, respectivamente, na determinação de Mn em leite digerido em sistema micro-ondas usando $Mg(NO_3)_2$ como modificador (FUENTE et al., 1995). Pode-se observar que existem diferenças significativas nas temperaturas obtidas univariadamente e multivariadamente. Esta diferença é esperada, uma vez que efeitos de segunda ordem foram significativos.

5.4.3.2 Parâmetros de mérito

As características analíticas foram obtidas para verificação do desempenho do método e avaliadas segundo os critérios citados na seção 1.4.

Os resultados obtidos no estudo do efeito de matriz podem ser visualizados na tabela 5.27. As amostras foram agrupadas por similaridade e amostras compostas foram preparadas para este estudo.

Tabela 5.27 Resultados da calibração através de curvas de adição de analito para as amostras compostas e curvas aquosas na avaliação do efeito de matriz na determinação de Mn em leite e similares pelo método otimizado.

Curvas de adição de analito			Curvas aquosas [a]	
Amostra	Inclinação e desvio obtido pela regressão	*r*	Inclinação e desvio obtido pela regressão	*r*
A1	0,0159 ± 0,0003	0,9993	0,0192 ± 0,0007	0,9979
A2	0,0171 ± 0,0008	0,9964	0,0207 ± 0,0010	0,9957
A3	0,0187 ± 0,0024	0,9947	0,0197 ± 0,0015	0,9917
A4	0,0204 ± 0,00153	0,9917	0,0190 ± 0,0011	0,9951
A5	0,0188 ± 0,0012	0,9939	0,0192 ± 0,0007	0,9979

[a] Curvas aquosas obtidas em condições de repetitividade em relação à curva de adição de analito correspondente.

Curvas de calibração aquosas e pelo método das adições foram obtidas usando cinco níveis de concentração com valores de r próximos de 1,00.

Comparando as inclinações das curvas realizadas em condições de repetitividade, verifica-se que as inclinações da curvas de adição de A3 é estatisticamente semelhante à inclinação da curva aquosa (limite de confiança de 95%, testes *F* e *t*), ao contrário das demais. Isso sugere uma calibração aquosa para determinação de Mn nas amostras de bebida láctea, leite integral visto que não há efeito de matriz sobre o sinal do analito. No caso dos outros tipos de matriz, a calibração deve se processar pelo método das adições de analito.

Os demais parâmetros analíticos de mérito foram obtidos baseados na calibração aquosa (Tabela 5.28).

Tabela 5.28 Características de desempenho do método otimizado para determinação de Mn em leites e similares por GFAAS.

Parâmetros	Resultados [e]
Faixa de trabalho linear (μg L^{-1})	3,3 a 20
Limite de detecção, LD (μg L^{-1})	(0,98 ± 0,24)
Limite de detecção, LD (μg kg^{-1})	(19,6 ± 4,8)
Limite de quantificação, LQ (μg L^{-1})	(3,23 ± 0,79)
Limite de quantificação, LQ (μg kg^{-1})	(64,6 ± 15,8)
Precisão, DPR[a] (%),	1,0 a 6,5
Exatidão (SRM 8435, μg g^{-1})[b]	(0,16 ± 0,04)
Exatidão (SRM 1549, μg g^{-1})[c]	(0,26 ± 0,05)
Massa característica[d] (pg)	(3,0 ± 0,4)

[a] 3 amostras, níveis de concentração 5, 10 e 20 μg L^{-1}.
[b] Valor certificado: (0,17 ± 0,05) μg g^{-1}.
[c] Valor certificado: (0,26 ± 0,06) μg g^{-1}
[d] Massa característica recomendada: 2 pg
[e] Os valores entre parênteses referem-se à média ± desvio padrão.

O limite de detecção (0,98 ± 0,24 μg L^{-1}) e o limite de quantificação (3,23 ± 0,79 μg L^{-1}) foram calculados pelo critério IUPAC.

A sensibilidade foi avaliada calculando a massa característica, que foi de (3,0 ± 0,4 pg) e comparando com o valor recomendado (2 pg) e foi considerada adequada. Comparativamente, Hsiang, Sung e Huang (2004) determinaram Mn em urina por GFAAS obtendo massa característica de 7,1 pg sendo 6,3 pg a recomendada pelo fabricante do espectrômetro.

A linearidade foi estimada pela construção das curvas de calibração aquosa em faixa de trabalho de 0,0 a 100,0 μg L^{-1} obtendo-se visualmente bons resultados na faixa de 0,0 a 20,0 μg L^{-1}. Os coeficientes de correlação das curvas de calibração apresentaram-se adequados, com valores de r superiores a 0,99 e todas as curvas apresentaram aspecto linear. Os desvios padrão relativos (DPR) apresentaram-se

dentro dos valores aceitáveis para precisão (GUILHEN et al., 2010; HUBER, 2001), não ultrapassando 6,5%.

As concentrações de Mn nos materiais de referência foram estatisticamente iguais aos valores certificados (nível de confiança 95%, teste *F* e *t*), indicando que a exatidão do método é adequada.

5.4.3.3 Aplicação do método

Os resultados das determinações de Mn em várias amostras e materiais certificados são mostrados na tabela 5.29. As concentrações de Mn foram críticas em amostras de bebida de soja e fórmulas infantis, apresentando teores relativamente elevados. A menor e a maior concentração em $\mu g\ g^{-1}$ foram, respectivamente: em leite integral, 0,35 e 0,90 (n=7); em bebida láctea, 0,21 e 0,48 (n=3); em leite desnatado 0,29 e 0,68 (n=2); em fórmulas infantis, 0,46 e 19,82 (n=9); em bebida de soja, 3,16 e 26,32 (n=4); em leite de cabra, 0,52 (n=1). O conteúdo de Mn foi maior em bebida de soja e fórmulas infantis (tabela 5.29). Considerando um consumo de quatro mamadeiras por dia, a entrada de Mn pela dieta de uma criança de seis meses a um ano ultrapassa o nível recomendado de 0,6 mg por dia (ANVISA, 2005) quando algumas fórmulas infantis e bebidas de soja são consideradas. Devido à maior sensibilidade de bebês e crianças ao Mn, a investigação e o controle do conteúdo deste elemento são extremamente necessários (GARCIA, 2007). O teor tem sido relatado na faixa de 0,042 a 2,4 $\mu g\ g^{-1}$ em fórmulas à base de soja e 0,053 a 0,16 $\mu g\ g^{-1}$ em fórmulas à base de leite (DABEKA; MCKENZIE, 1992).

Tabela 5.29 Concentração de Mn em diferentes amostras de leite e similares pelo método proposto.

Amostra	Concentração de Mn[a] ($\mu g\ g^{-1}$)	Entrada de Mn por dia[b] (mg)
Leite integral I1	0,90 ± 0,08	0,135
Leite integral I2	0,75 ± 0,08	0,113
Leite integral I3	0,83 ± 0,08	0,125
Leite integral IE1	0,45 ± 0,10	0,068
Leite integral I4	0,35 ± 0,07	0,053
Leite integral I5	0,69 ± 0,19	0,104
Leite integral I6	0,35 ± 0,02	0,053
Bebida láctea M1	0,48 ± 0,05	0,072
Bebida láctea M2	0,31 ± 0,02	0,047
Bebida láctea M3	0,21 ± 0,02	0,032
Leite desnatado D1	0,29 ± 0,04	0,044
Leite desnatado D2	0,68 ± 0,08	0,102
Fórmula infantil F1	0,73 ± 0,02	0,110
Fórmula infantil F2	0,46 ± 0,15	0,069
Fórmula infantil DE1	1,28 ± 0,11	0,192
Fórmula infantil DE2	19,82 ± 2,14	2,973
Fórmula infantil F3	1,34 ± 0,28	0,201
Fórmula infantil F4	1,08 ± 0,08	0,162
Fórmula infantil F5	0,94 ± 0,03	0,141
Fórmula infantil F7	0,79 ± 0,16	0,119
Fórmula infantil F8	0,86 ± 0,01	0,129
Bebida de soja S1	11,45 ± 0,47	1,718
Bebida de soja S2	3,16 ± 0,12	0,474
Fórmula infantil à base de soja FS1	9,75 ± 0,06	1,463
Bebida de soja S3	26,32 ± 0,76	3,948
Fórmula infantil à base de soja FS2	6,13 ± 2,31	0,920
Leite de cabra C1	0,52 ± 0,05	0,078

[a] Média ± desvio padrão (n=3).
[b] Considerando o consumo de 1 L de alimento reconstituído (4 mamadeiras de 250 mL)

5.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO

5.5.1. Otimização das condições analíticas

Foram realizadas várias medidas de absorvância integrada e sinal de fundo nas condições recomendadas de 20 μL de amostra em presença de diversos modificadores químicos: modificadores permanentes (W, Rh, Ir, Zr, Nb, Ta, Ru), depositados na plataforma (Ir, Rh, Ru) ou nas paredes do tubo (W, Zr, Nb, Ta); modificadores em solução (Pd, Mg, Eu, Lu, Ho, Er) e a combinação de alguns deles. Modificadores convencionais (Pd e Mg) e lantanídeos foram utilizados na forma de solução: 15 μg Pd e 10 μg Mg, 5 μg Pd, 5 μg Mg, 5 μg Eu, 5 μg Lu, 5 μg Ho, e 5,0 μg Er. A condição sem modificador também foi avaliada. Foi empregado o programa de temperatura recomendado pelo fabricante durante esta avaliação.

A etapa de secagem foi otimizada como descrito anteriormente (seção 5.2.1). O programa de temperatura utilizado na otimização é mostrado na tabela 5.30. Para evitar a formação de resíduos carbonáceos, utilizou-se CTAC (seção 5.2.1).

Amostras de leite integral e desnatado, fórmula infantil e bebida láctea, obtidas no comércio local (seção 3.1.3), foram preparadas dissolvendo as amostras em água purificada, seguindo as instruções do fabricante, a cerca de 10% m/v e depois foram sonicadas por 10 a 30 minutos para estabilizar as suspensões. Foi utilizado um volume de 20 μL das amostras preparadas nas injeções no forno de grafite. Para desenvolver um método único para determinação de Mo para todas as amostras, uma mistura de iguais volumes de diferentes tipos de amostras compostas foi usado nas otimizações e estudos de validação.

Tabela 5.30 Programa de temperatura usado na otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Fluxo de Argônio (mL min^{-1})
Secagem	90	5	5	250
Secagem	90	5	60	250
Pirólise	[a]	10	[c]	250
Atomização	[b]	0	5	0 (leitura)
Limpeza	2700	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

[a,b,c]Variáveis otimizadas.

Após a escolha dos melhores modificadores, dois planejamentos experimentais foram realizados para avaliar a influência das variáveis e suas interações e para determinar as condições ótimas experimentais. No primeiro planejamento (fatorial 2^3, 8 experimentos, triplicata), os fatores estudados foram: tempo de pirólise de 20 e 60 s; temperatura de pirólise de 1100 e 2000 °C, temperatura de atomização de 2400 e 2600 °C (tabela 5.31). Nesta otimização a mistura Eu + Nb foi utilizada como modificador permanente.

Baseado nos resultados do primeiro planejamento, o tempo de pirólise foi fixo enquanto as temperaturas ótimas de pirólise e atomização eram determinadas através de um planejamento composto central (CCD, 13 experimentos, incluindo 5 replicatas no ponto central) que é apresentado na tabela 5.32. Para efetuar os cálculos foi utilizado o programa Statistica 6.1 (Statsoft).

Se o sinal analítico é baixo, pequenas quantidades do elemento podem ser adicionadas à amostra para a otimização, com a finalidade de alcançar uma absorbância integrada adequada. No caso das amostras estudadas, a contaminação não foi necessária, pois as concentrações de Mo nas amostras foram apropriadas para otimização das condições analíticas.

Tabela 5.31 Níveis estudados no planejamento fatorial para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS

Variável	Nível inferior (-1)	Nível Superior (+1)
Temperatura de pirólise (^{o}C)	1100	2000
Temperatura de atomização (^{o}C)	2400	2600
Tempo de duração da pirólise (s)	20	60

Tabela 5.32 Níveis estudados no CCD para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS .

Fatores	Níveis Avaliados[c]
TP[a] (^{o}C)	770 ($-\sqrt{2}$), 1000 (-1), 1550 (0), 2100 (+1), 2330 ($\sqrt{2}$)
TA[b] (^{o}C)	2360 ($-\sqrt{2}$,) 2400 (-1), 2500 (0), 2600 (+1), 2640 ($\sqrt{2}$)

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Os valores entre parênteses correspondem ao valor codificado.

5.5.2 Parâmetros de mérito

As características de desempenho do método foram determinadas de forma semelhante ao descrito na seção 1.4.

5.5.3 Resultados e discussão

5.5.3.1 Otimização das condições analíticas

A determinação direta de Mo em algumas amostras, como o leite, pode ser complicada devido à composição da matriz, que produz um alto sinal de fundo. Além disso, o Mo é refratário, o que pode diminuir a sensibilidade pela dificuldade de atomização. As dificuldades causadas pela complexidade da amostra podem ser superadas pelo emprego de modificadores e outros agentes químicos.

O uso de lantanídeos como modificadores é ainda incomum. Somente poucos trabalhos foram relatados com esta aplicação (BURGUERA et al., 1999; BURGUERA et al., 2002). Estes trabalhos mostram que o uso de lantanídeos como modificadores químicos pode melhorar as condições analíticas.

A tabela 5.33 apresenta os resultados obtidos para os modificadores avaliados. As modificações químicas que apresentaram maior sensibilidade foram Eu + Nb e Eu e boa precisão foi obtida com Lu (6%) e Eu + Nb (9%). Com relação ao sinal de absorção de fundo os melhores resultados foram alcançados quando Eu + Nb foram empregados. Nos casos estudados, esta mistura apresentou melhores resultados de sinal de fundo, melhor sensibilidade e precisão (menor DPR). A forma do pico foi avaliada simultaneamente, e a mistura Eu + Nb apresentou o melhor pico, com menor sinal de ruído e simetria satisfatória quando comparado aos demais (figura 5.21).

Tabela 5.33 Avaliação de modificadores para a determinação de Mo em leites e similares empregando a amostra não-fortificada nas condições do fabricante[e].

Modificação química	Abs. Integrada (A s^{-1})	DPR (%)	Absorção de fundo
Sem modificador	-0,085	19	0,087
Zr[a]	-0,067	25	0,068
Ir[a]	-0,082	35	0,084
Rh[a]	-0,081	78	0,082
W[a]	0,002	108	0,104
Ru[a]	0,059	14	0,330
Nb[a]	0,031	62	0,419
Ta[a]	0,020	89	0,353
Er [b]	0,037	22	0,216
Ho[b]	0,048	22	0,174
Eu [b]	0,092	11	0,123
Lu[b]	0,040	6	0,052
Eu[b] + Zr[a]	0,007	24	0,069
Eu[b] + Ru[a]	-0,012	14	0,251
Eu[b] + Nb[a]	0,165	9	0,005
Pd[b]	0,015	76	0,132
Mg[b]	0,007	111	0,177
Pd[c] + Mg[d]	0,022	14	0,031

[a] 500 μg termicamente depositado. [b] co-injeção de 5 μg com a amostra. [c]15 μg. [d]10 μg. [e]condições do fabricante: 1500 (TP) e 2600 (TA).

Burguera e colaboradores (2002) obtiveram melhores resultados com uso de Er na modificação química para determinação de Mo em sangue por GFAAS. Entretanto, para os estudos aqui realizados Eu + Nb permanente se mostraram adequados em todas as etapas de otimização.

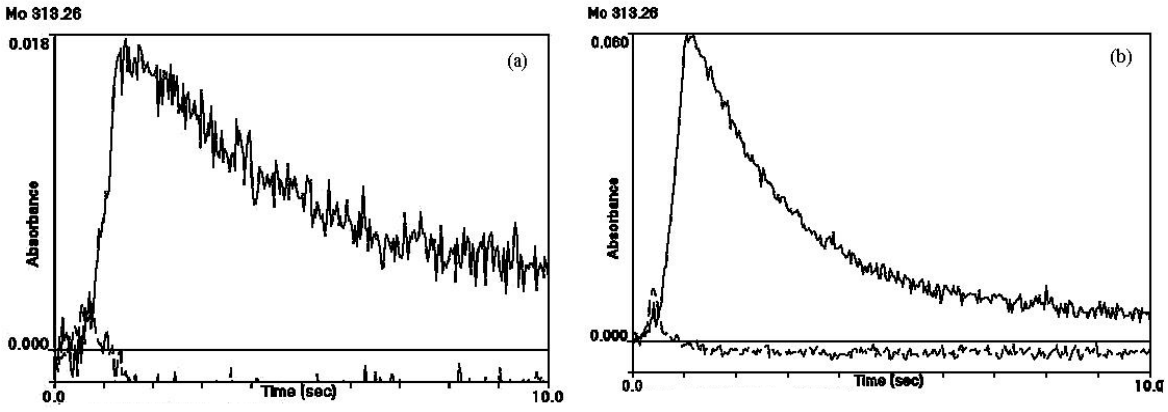

Figura 5.21 Perfil de pico obtido empregando európio (a) e európio com nióbio permanente (b) como modificadores em amostra composta não-fortificada com Mo .

Os resultados do planejamento fatorial são mostrados na tabela 5.34 e no gráfico de Pareto (figura 5.22). As variáveis que tiveram efeito significativo sobre a resposta (absorvância) foram temperatura de pirólise e de atomização (*TP e TA*, respectivamente), as interações entre *TP* e *TA* e as interações entre tempo (*t*) e *TP*, a um nível de confiança de 95 %. Baseado nestes resultados, o efeito de TA foi positivo, indicando que maiores temperaturas de atomização podem aumentar o sinal analítico. O efeito de TP foi negativo, indicando menores TP, enquanto o efeito do tempo de pirólise apesar de negativo, não foi pronunciado. Assim, t foi fixado no menor nível testado, 20 s. Para avaliar tempos menores, seria necessário realizar novo planejamento fatorial, mas seria desnecessário uma vez que o tempo de pirólise, t, apresentou baixo efeito sobre a resposta (figura 5.22).

Tabela 5.34 Resultados obtidos no planejamento fatorial empregado para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS.

Experimento	TP[a] (°C)	TA[b] (°C)	Tempo[c] (s)	Abs. Integrada média e desvio padrão (n=3)
1	1100	2400	20	0,125 ± 0,017
2	2000	2400	20	0,106 ± 0,002
3	1100	2600	20	0,285 ± 0,016
4	2000	2600	20	0,262 ± 0,007
5	1100	2400	60	0,163 ± 0,008
6	2000	2400	60	0,062 ± 0,010
7	1100	2600	60	0,255 ± 0,008
8	2000	2600	60	0,240 ± 0,004

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Tempo de pirólise.

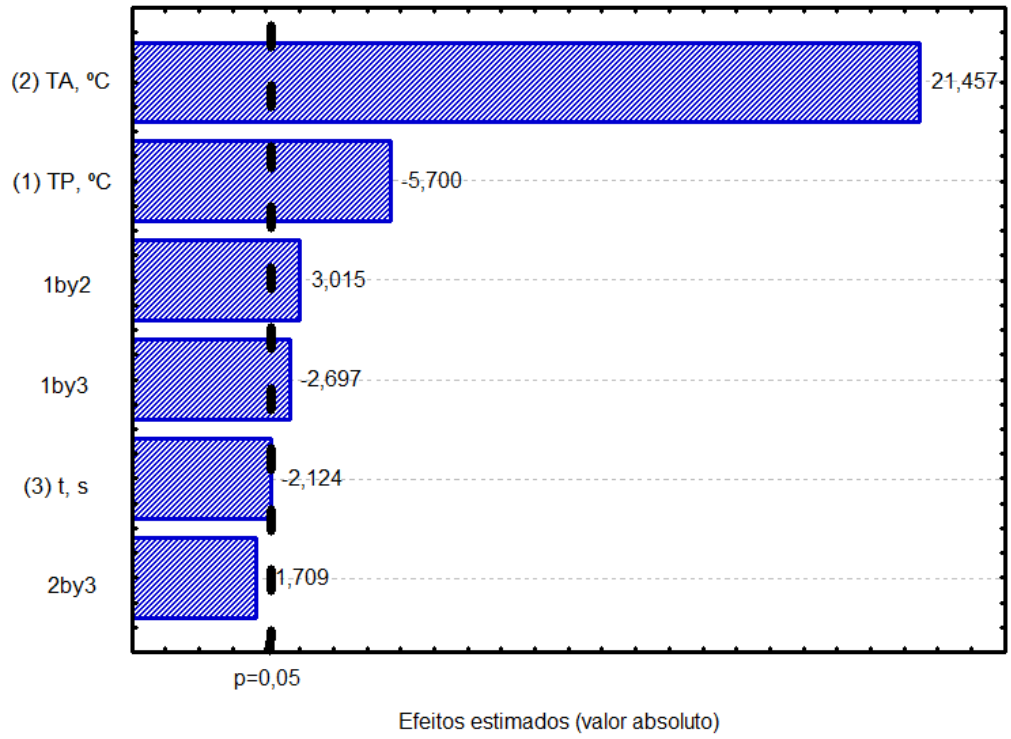

Figura 5.22. Gráfico de Pareto obtido do planejamento fatorial empregado para otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS (TP, temperatura de pirólise; TA, temperatura de atomização; t, tempo de pirólise).

Após avaliação das variáveis significativas, uma metodologia de superfície de resposta (CCD) foi realizada para se obter as temperaturas de pirólise e atomização ótimas para a determinação de Mo em leites e similares. Os efeitos de cada variável e suas interações sobre a superfície de resposta foram avaliados e podem ser visualizados na tabela 5.35.

Tabela 5.35 Resultados obtidos no planejamento composto central (CCD) empregado na otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS.

Experimento	TP[a] (°C)	TA[b] (°C)	Abs. Integrada média e desvio padrão (n=3)
1	1000	2400	0,070 ± 0,001
2	1000	2600	0,157 ± 0,007
3	2100	2400	0,055 ± 0,006
4	2100	2600	0,164 ± 0,007
5	770	2500	-0,088 ± 0,015
6	2330	2500	0,048 ± 0,001
7	1550	2360	0,018 ± 0,008
8	1550	2640	0,126 ± 0,001
9 (PC)[c]	1550	2500	0,052 ± 0,008

[a] Temperatura de pirólise. [b] Temperatura de atomização. [c] Replicatas no ponto central (PC): 8

A temperatura de atomização e sua interação quadrática mostraram efeitos significativos a um nível de confiança de 95%. Um modelo quadrático foi obtido após testes de ajuste e adequação por uma análise de variância. A equação polinomial ajustada foi expressa como uma superfície e seus contornos para visualização do comportamento do sistema bem como de seus pontos críticos (condições ótimas) (figura 5.23).

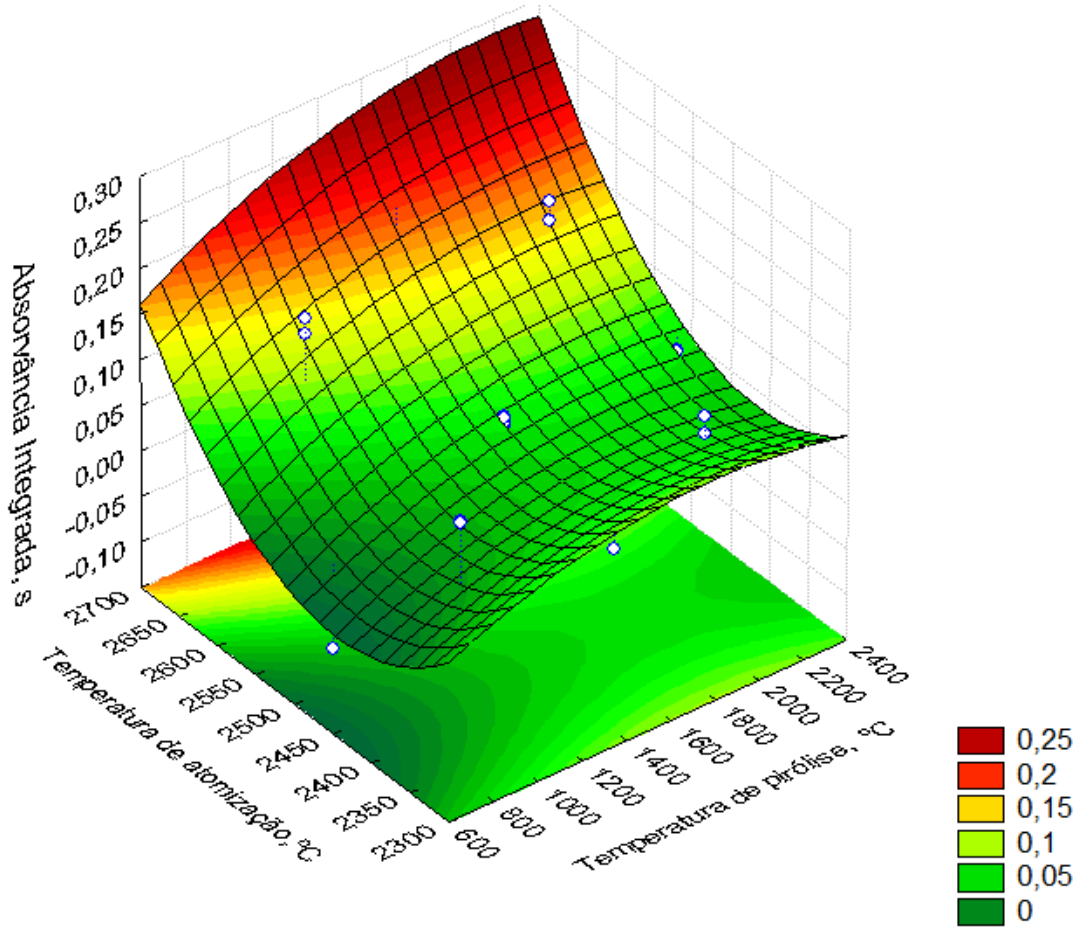

Figura 5.23 Superfície de resposta e seus contornos obtidos do CCD empregado na otimização do método para determinação de Mo em leites e similares por GFAAS.

O modelo quadrático foi expresso de acordo com a equação

$$A = 18{,}7416 - 1{,}5377 \times 10^{-2}\,(TA) + 3{,}1313 \times 10^{-6}\,(TA)^2 + 1{,}0000 \times 10^{-7}\,(TP)\,(TA)$$

(equação 8)

onde *A* é a resposta absorvância integrada, *TP* é a temperatura de pirólise e *TA* é a temperatura de atomização. A superfície de resposta mostrou um ponto de mínimo que foi calculado e obtido pelas coordenadas *(TP), (TA)* = (1904, 2424). Este ponto caracteriza-se por menor sensibilidade. Observando a superfície de resposta percebe-se que um aumento da TA sugere aumento de sensibilidade, sugerindo uma expansão para investigação de TA´s acima de 2700 ºC. Entretanto, o espectrômetro empregado não permite este estudo. Com análise dos contornos sob a superfície (figura 5.23), a

maior sensibilidade se encontra em *TP* ≥ 2000 ºC e *TA* = 2700 ºC. Como *TP* não apresentou efeito significativo, a temperatura pode ser fixada em 2000ºC. Assim, foi possível estabelecer um melhor programa de temperatura para o método.

Analisando os sinais de fundo, foi confirmado que sob estas condições de *TP* e *TA* (2000 ºC e 2700 ºC, respectivamente) não há problemas com absorção de fundo. Burguera e colaboradores (2002) obtiveram TP e TA de 1200 ºC e 2700 ºC, respectivamente, na determinação de Mo em sangue usando Er como modificador. Lopez-Garcia e colaboradores (2007) determinaram Mo em amostras de leite em pó empregando Pd como modificador com TP e TA de 1800 e 2600 ºC, respectivamente.

5.5.3.2 Parâmetros de mérito

Usando as condições experimentais otimizadas, os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos determinados (Tabela 5.36). Curvas de calibração aquosas e pelo método das adições foram criadas usando água, amostras compostas de fórmulas infantis, bebida láctea, leite desnatado e leite integral usando cinco níveis de concentração com valores de coeficiente de correlação (*r)* próximos de 1,00. Como mostrado na tabela 5.36, comparando as curvas de calibração aquosas e de adição de padrão para cada amostra, as inclinações apresentam-se próximas, e não há diferenças significativas a um nível de confiança de 95% (teste *F* e *t*), exceto para a calibração da curva de leite desnatado. Assim, a calibração foi realizada através de curvas aquosas para a maioria das amostras e através do método de adição de padrão para leite desnatado.

O limite de detecção (LD) foi calculado pelo critério IUPAC. A sensibilidade foi avaliada pelo cálculo da massa característica (7,9 ± 0,8 pg) e o valor obtido foi comparado com o valor recomendado (9,0 pg). Comparativamente, Burguera e colaboradores (2002) determinaram Mo em amostras de sangue por GFAAS obtendo massa característica de 7,2 pg usando Er como modificador e Lopez-Garcia e colaboradores (2007) obtiveram 25 pg no método para amostras de leite usando Pd

como modificador. A linearidade foi estimada pela construção de curvas de calibração aquosas de 0,0 a 100,0 μg L^{-1}, e foi verificada uma boa linearidade em toda a faixa. Na avaliação da exatidão, recuperações variando de 94 a 118 % foram obtidas para a quantificação de Mo em amostras fortificadas (30 a 90 μg L^{-1}). Em adição, a análise de material de referência certificado apresentou concentração estatisticamente igual ao valor de referência para um nível de confiança 95%. A repetitividade foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) para diferentes concentrações dentro da faixa linear e estes valores se apresentarem entre 0,6 e 8,7%.

Tabela 5.36 Características de desempenho do método otimizado para a determinação de Mo em leites e similares por GFAAS.

Parâmetros	Resultados [c]
Faixa de trabalho linear estudada (μg L-1)	3,7 – 100,0
Massa característica, m_o (pg)	(7,9 ± 0,8)
Limite de detecção, LD (μg L^{-1})	(1,1 ± 0,1)
Limite de detecção, LD, (μg kg^{-1})	(11 ± 1)
Equação – calibração aquosa	y = 0,0063 x + 0,0128
Equações – método de adição de padrão:	
Leite desnatado	y = 0,0097 x + 0,1253
Fórmula infantil	y = 0,0066 x + 0,720
Bebida láctea	y = 0,0077 x + 0,2574
Precisão, DPR[a] (%)	0,6 a 8,7
Recuperação (30 a 90 μg L^{-1}) (%)	94 a 118
Exatidão [b] (SRM - IAEA 153)	(0,32 ± 0,03)

[a] 30 a 90 μg L^{-1}. [b] Valor informado: 0,31 μg g^{-1}. [c] Os valores entre parênteses referem-se à média ± desvio padrão. [d] Valor recomendado pelo fabricante: 9,0 pg

5.5.3.3 Aplicação do método

O procedimento otimizado foi aplicado à determinação de Mo em 13 amostras obtidas no comércio local (seção 3.1.3). Os resultados da análise de leite e similares são mostrados na tabela 5.37. As recomendações para preparo das amostras pelos

fabricantes são cerca de 15% m/v para estes alimentos. As concentrações do elemento apresentaram-se na faixa de 0,22 - 0,40 μg g^{-1} para leite integral, 0,04 -1,57 μg g^{-1} para bebida láctea e 0,33 - 0,43 μg g^{-1} para fórmula infantil; uma amostra de leite desnatado apresentou concentração de 0,34 μg g^{-1}. Cava-Montesinos e colaboradores (2005) encontraram concentrações de Mo em 11 amostras leite em pó na faixa de 0,01 a 0,27 μg g^{-1} por ICP-MS. Em outro trabalho, ETAAS foi empregada para determinação de Mo em fórmulas infantis à base de leite e as concentrações apresentaram-se na faixa de 0,02 a 0,27 μg g^{-1} (LOPEZ-GARCIA et al., 2007). A ingestão diária recomendada varia de 2 μg (crianças entre 0 e 6 meses) a 45 μg para adultos (ANVISA, 2005). A maior concentração de Mo foi obtida em uma amostra de bebida láctea (1,57 μg g^{-1}); considerando o consumo de 200 mL deste alimento reconstituído, acarretaria na ingestão de 47,1 μg, quantidade um pouco superior ao recomendado para adultos. Desta forma, este alimento especificamente pode não ser indicado para crianças.

Tabela 5.37 Concentrações de molibdênio em leite e alimentos infantis similares determinadas pelo método proposto.

Amostras	Concentração[a] ($\mu g\ g^{-1}$)
Leite integral A	0,37 ± 0,05
Leite integral B	0,22 ± 0,03
Leite integral C	0,27 ± 0,02
Leite integral D	0,30 ± 0,04
Leite integral E	0,40 ± 0,02
Bebida láctea A	1,57 ± 0,28
Bebida láctea B	0,04 ± 0,01
Bebida láctea C	0,32 ± 0,01
Fórmula infantil A	0,43 ± 0,02
Fórmula infantil B	0,36 ± 0,01
Fórmula infantil C	0,37 ± 0,06
Fórmula infantil D	0,33 ± 0,02
Leite desnatado A	0,03 ± 0,01

[a] Média ± desvio padrão (n=3)

CAPÍTULO VI. CONCLUSÕES

O uso de ICP-MS possibilitou a verificação da constituição de amostras de leite e alimentos infantis similares, permitindo uma avaliação global destas amostras, revelando os principais íons metálicos presentes, bem como a sua faixa de concentração. Na análise exploratória dos dados, não foi possível estabelecer relações entre as concentrações dos elementos e tipos de amostras.

A análise sem prévia decomposição é uma alternativa rápida, simples e de baixo custo. O grande fator limitante neste caso é o efeito de matriz, que pode tornar seu uso um pouco mais trabalhoso se for necessário proceder às calibrações pelo método de adição de analito.

O método de determinação de Zn sem prévia decomposição por FAAS em amostras de leite integral em pó é viável, pois apresentou a possibilidade de calibração aquosa para algumas amostras, baixo limite de detecção e exatidão adequada.

Foi possível estabelecer condições analíticas adequadas para determinação de Al, Cr, Mn e Mo por GFAAS em amostras de leite e alimentos infantis similares. Os métodos propostos apresentaram a análise sem prévia decomposição como uma alternativa rápida, simples e com características analíticas satisfatórias, como sensibilidade, exatidão e precisão. As condições analíticas determinadas pelo métodos univariados (construção de curvas de pirólise e atomização) foram diferentes das condições obtidas pelo método multivariado.

O planejamento de experimentos mostrou-se útil na obtenção de condições ótimas para determinação de íons metálicos por GFAAS, auxiliando na escolha de melhores condições para a análise sem prévia decomposição, inclusive na avaliação de condições de menor interferência (menor absorção de fundo). A grande vantagem da otimização multivariada é a minimização do número de experimentos e também a possibilidade de se estabelecer condições ótimas verdadeiras através da avaliação das

interações entre as variáveis. Não pode ser descartada a necessidade do conhecimento da técnica analítica, do método empregado e da matriz em estudo, uma vez que nem sempre é possível expandir o domínio experimental e algumas vezes é necessário tirar conclusões indiretas sobre as informações iniciais baseando-se no conhecimento do comportamento químico do sistema investigado.

A análise das amostras revelou diversos casos alarmantes, com amostras contendo níveis elevados de alguns elementos, provavelmente por causa de possíveis contaminações e adulterações que podem ocorrer durante as diferentes etapas de processamento, acondicionamento e armazenagem dos produtos. Este fato confirma a importância do controle de qualidade em amostras de alimentos infantis, principalmente devido à maior suscetibilidade à toxicidade dos elementos pelas crianças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T. S. Trace-element status in milk and plasma of Kuwaiti and non-Kuwaiti lactating mothers. **Nutrition** 16 (2000) 1069.

ALVARADO, J.; LEÓN; L.E.; LÓPEZ, F; LIMA, C. Comparison of Conventional and Microwave Wet Acid Digestion Procedures for the Determination of Iron, Nickel and Vanadium in Coal by Electrothermal Atomization. Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 3 (1988) 135.

AMORIM, F.R; BOF, C.; FRANCO, M.B.; SILVA, J.B.B.; NASCENTES, C.C. Comparative study of conventional and multivariate methods for aluminum determination in soft drinks by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal** 82 (2006) 168.

ANVISA, 1998. Portaria n º 31, de 13 de janeiro de 1998 da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico Para Fixação De Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de março de 1998. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/31_98.htm, data de acesso 14/09/07.

_____, 1998b. Portaria n º 977, de 05 de dezembro de 1998 da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Fórmulas Infantis para Lactentes.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 15 de abril de 1999. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/977_98.htm, data de acesso 14/09/07.

_____, 2000. Resolução RDC nº 91, de 18 de outubro de 2000 da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimento com Soja**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 20 de outubro de 2000. Disponível em http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=215, data de acesso 14/08/07.

_____, 2003. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003 da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 26 de dezembro de 2003. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php, data de acesso 14/08/07.

_____, 2003b. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php, data de acesso 14/08/07.

_____, 2005. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 – **Aprova Regulamento**

Técnico Sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. - ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php, data de acesso: 14/08/07.

ARRUDA, M.A.Z.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Automatic preparation of milk dessert slurries for the determination of trace amounts of aluminum by electrothermal absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 10 (1995) 55

ARRUDA, M.A.Z.; QUINTELA, M.J.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Direct Analysis of Milk for Aluminum Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Analyst** 119 (1994) 1695.

ATARO, A.; McCRINDLE, R.I. BOTHA, B.M.; McCRINDLE, C.M.E.; NDIBEWU, P.P. Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Food Chemistry** 111 (2008) 243.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. **Toxicological profile for aluminum.** Atlanta, 2006, 352 p.

_____. Agency for toxic substances and disease registry. **Toxicological profile for zinc**. Atlanta, 2005, 357 p

_____. Agency for toxic substances and disease registry. **Toxicological profile for zinc**. Atlanta, 1994, 243 p.

_____. Agency for toxic substances and disease registry. **Toxicological profile for manganese.** Atlanta, 2000, 504 p.

AYAR, A.; SERT, D.; AKIN, N. The trace metal levels in milk and dairy products consumed in middle Anatolia—Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**. (2009) 152:1–12

AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. da M. **Metais: Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Ed. Ateneu, 2003.

BEATY, R. D., KERBER, J. D. Concepts, **Instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry.** Norwalk, Ed. The Perkin-Elmer Corporation, 1993.

BERMEJO, P.; DOMINGUEZ, R.; BERMEJO, A. Direct determination of Fe and Zn in different components of cow milk by FAAS with a high performance nebulizer. **Talanta** 45 (1997) 325

BERTHOLF, R.L.; WILLS, M.R.; SAVORY, J. H**andbook on Toxicity of Inorganic Compounds**, H.G. Seiler, H. Sigel, editors. New York: Marcel Dekker, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Política de Saúde. Organização Pan Americana da Saúde. **Guia alimentar para crianças menores de dois anos.**

Secretaria de Políticas de Saúde, Organização Pan Americana da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2002. Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/Guiaaliment.pdf>. Acesso em 05 de janeiro de 2010.

BROEKAERT, J.A.C. **Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas**. Wiley-VCH, 2002. 347 p.

BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; RONDON, C.; RODRIGUEZ, L.; CARRERO, P., de PENA, Y.P.; BURGUERA, E. Determination of chromium in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using different chemical modifiers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 14 (1999) 821.

BURGUERA, J. L.; RONDON, C.; BURGUERA, M.; ROA, M. E.; PEÑA, Y. P. de. Electrothermal atomic absorption spectrometry determination of molybdenum in whole blood. **Spectrochimica Acta Part B** 57 (2002) 561.

CASARETT, L. J.; DOULL, J. **Casarett and Doull's toxicology**. Londres: Ed. Macmillan Publishing Company, 1986.

CASÉ, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. MANTOVANI, D.; FELBERG, I. Produção de 'Leite' de Soja Enriquecido com Cálcio **. Ciência e Tecnologia de Alimentos** 25 (2005) 86.

CASEY, C. E.; HAMBIDGE, K. M.; NEVILLE, M. C. Studies in human lactation: zinc, copper, manganese and chromium in human milk in the first month of lactation. **The American Journal of Clinical Nutrition** 41 (1985) 1193.

CASSELA, R.J.; de SANT'ANA, O.D.; SANTELLI, R.E. Determination of arsenic in petroleum refinery streams by electrothermal atomic absorption spectrometry after multivariate optimization based on Doehlert design. **Spectrochimica Acta Part B** 57 (2002) 1967.

CASTRO, M.T.P.O.; BACCAN, N. Applications of factorial design in optimization of preconcentration procedure for copper determination in soft drink by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta** 65 (2005) 1264.

CAVA-MONTESINOS, P.; LUISA C. M.; PASTOR, A; de la GUARDIA, M. Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk. **Analytica Chimica Acta** 531 (2005) 111.

CHANDRA, R.K. **Trace Elements in Nutrition of Children**, Raven Press, New York, 1988.

CHMILENKO, F.A.; BAKLANOV, A.N. Intensification of sample preparation in the determination of impurity elements in foodstuffs. **Journal of Analytical Chemistry**. URSS, 54 (1999) 2.

CONI, E.; BOCCA, A.; COPPOLELLI, P.; CAROLI, S.; CAVALLUCCI, C.; MARINUCCI, M.T. Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. **Food Chemistry** 57 (1996) 253.

DA SILVA, J.B.B.; GIACOMELLI, M.B.O.; DE SOUZA, I.G.; CURTIUS, A.J. Iridium and rhodium as permanent chemical modifiers for the determination of Ag, As, Bi, Cd and Sb by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal** 60 (1998) 249.

DABEKA, R.W.; MCKENZIE A.D. Graphite-Furnace Atomic-Absorption Spectrometric determination and Survey of Total Aluminum, Copper, Manganese, Molybdenum, and Tin in Infant Formulas and Evaporated Milks. **Journal df AOAC International** 75 (1992) 954.

ERIKSON, K.M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity: A focus on the neonate. **Pharmacology & Therapeutics** 113 (2007) 369.

EURACHEM. CITAC (The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry) e EURACHEM (A Focus for Analytical Chemistry in Europe). **Guide to Quality in Analytical Chemistry**. 2002.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 307p.

FRAZZOLI, CHIARA; BOCCA, BEATRICE; Validation, uncertainty estimation and application of a sector field ICP MS-based method for As, Cd and Pb in cow's milk and infant formulas. **Microchimica Acta** 162 (2008) 43.

FUENTE DE LA, M.A; GUERRERO, G.; JUÁREZ, M. Manganese and Zinc Analysis in Milk by Microwave Oven Digestion and Platform Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43 (1995) 2406.

GARCIA, S.J.; GELLEIN, K.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Iron Deficient and Manganese Supplemented Diets Alter Metals and Transporters in the Developing Rat Brain. **Toxicological Sciences** 95 (2007) 205.

GARREC, H. L.; GIAMARCHI, P.; CABON, J.Y.; BIHAN, A. L. Electrothermic factors optimization in electrothermal atomic absorption spectrometry via an optimal experimental design matrix. **Analitica Chimica Acta** 368 (1998) 59

GERHARDSSON, L.; OSKARSSON, A.; SKERFVING, S. Acid precipitation effects on trace elements and human health. **Science of the Total Environment** 153 (1994) 237

GOYER, R.A. Toxic and essential metal interactions. **Annual Review of Nutrition**. 17 (1997) 37.

GUILHEN, S. N.; PIRES, M. A. F.; DANTAS, E. S. K.; XAVIER, F. V. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por

espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS): estudo de caso. **Química Nova** 33 (2010) 1285.

GULER, Z. Levels of 24 minerals in local goat Milk, its strained yoghurt and salted yoghurt (tuzlu yoghurt). **Small Ruminant Research** 71 (2007) 130.

HOLZINGER, S.; ANKE, M.; ROHRIG, B.; GONZALEZ, D. Molybdenum intake in adults in Germany and Mexico, Analyst 123 (1998) 447–450 apud BURGUERA, J.L. et al. **Spectrochimica Acta Part B** 57 (2002) 561.

HSIANG, M.; SUNG, Y.; HUANG, S. Direct and simultaneous determination of arsenic, manganese, cobalt and nickel in urine with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer. **Talanta** 62 (2004) 791.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International,** Fev. 1998. p. 96-105. Disponível em: <http://geocities.internetarchaeology.org/HotSprings/Spa/6896/methval.pdf>. Acesso em 05 de janeiro de 2010.

IKEM, A.; NWANKWOALA, A.; ODUEYUNGBO, S; NYAVOR, K.; EGIEBOR, N. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP OES. **Food Chemistry** 77 (2002) 439.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03: fev 2010.

IUPAC, 1992. URE, T.A.M.; BUTLER, L.R.P.; L'VOV, B.V.; RUBESKA I.; STURGEON R. **Part XII: Terms Related to Electrothermal Atomization (IUPAC Recommendations 1992**. Disponível em http://old.iupac.org/reports/V/spectro/partXII.pdf. Data de acesso 03/01/2010.

IUPAC. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC), **Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis** - II. Data interpretation. Pure & Applied Chemistry. 45 (1976) 99-103.

JENSEN, R.G. **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995.

KIRA, C. S.; MAIHARA, V. A.. Determination of major and minor elements in dairy products through inductively coupled plasma optical emission spectrometry after wet partial digestion and neutron activation analysis. **Food Chemistry** 100 (2007) 390

LANTE, G.; LOMOLINO, M.; CAGNIN, P.; SPETTOLI, M. Content and characterization of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP OES. **Food Control** 17 (2006) 229.

LIDE, D.R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 87th edition. Taylor; Francis Group, 2006.

LIN, T.W.; HUANG, S.D. Direct and simultaneous determination of copper, chromium, aluminum, and manganese in urine with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer. **Analytical Chemistry** 73 (2001) 4319.

LOBO, A. S; TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição** 17 (2004) 107.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; VIÑAS, P.; ROMERO-ROMERO, R.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Liquid chromatography–electrothermal atomic absorption spectrometry for the separation and preconcentration of molybdenum in milk and infant formulas. **Analytica Chimica Acta** 597 (2007) 187.

MADER, P.; SZÁKOVA J., MIHOLOVÁ D., Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. **Analysis**, 26 (1998) 121.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição** 17 (2004) 79.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Instrução Normativa nº 16 de 23 de agosto de 2005**. Publicado no Diário Oficial da União de 24/08/2005 , Seção 1, Página 7. Disponível em http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta , acesso 14/08/07.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T.; WUTKE, E. B.; BRAGA, N. R.; MIRANDA, M. A. C. de. Alumínio e manganês no cultivo da soja em São Paulo. **O Agronômico**, 56 (2004) 16.

MASSEY, R.C.; TAYLOR, D. **Aluminum in food and the environment**. London: Royal Society of Chemistry, 1991.

MCKINSTRY, P.J.; INDYK, H.E.; KIM N.D.; The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulization and inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES) **Food Chemistry** 65 (1999) 245.

MINGORANCE, M. D.; PÉREZ-VAZQUEZ, M. L.; LACHICA, M. Microwave Digestion Methods for the Atomic Spectrometric Determination of Some Elements in Biological Samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 8 (1993) 858.

MOREDA-PIÑERO, J.; MOSCOSO-PÉREZ, C.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; FÉRNANDEZ-FÉRNANDEZ, E.; PRADA-RODRIGUEZ, D. Multivariate optimization of hydride generation procedures for single element determinations of As, Cd, Sb and Se in natural waters by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta** 53 (2001) 871.

MOTKOSKY, N.; KRATOCHVIL, B Characterization of Trace Amounts of Aluminum in Biological Reference Materials by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Analyst,** 118 (1993) 1313.

NASCENTES, C.C; ARRUDA, M.A.Z.; NOGUEIRA, A.R.N; NÓBREGA, J.A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta** 64 (2004) 912.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** Campinas: Ed. Unicamp, 1996.

NIOSH/OSHA, National Institute for Occupational Safety and Health/Occupational Safety and Health Administration. O**ccupational health guidelines for soluble molybdenum compounds (as molybdenum)**. NIOSH/OSHA, Washington, DC, 1978.

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. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 12 (1997) 1243.

NRC, National Research Council. **Recommended dietary allowances**, 10^{th} ed. National Academy Press, Washington, DC, 1989.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: 1996. 515p.

PECHOVA, A.; PAVLATA, L. Chromium as an essential nutrient: a review**. Veterinari Medicina**, 52 (2007) 1.

PENNINGTON, J.A.T.; JONES, J.W. **Aluminum in health: a critical review**. H.J. Fitelman, editor. New York: Ed. Marcel Dekker, 1989.

PEREIRA L. A.; DE AMORIM, I. G.; DA SILVA, J. B. B. Development of methodologies to determine aluminum, cadmium, chromium and lead in drinking water by ET AAS using permanent modifiers, **Talanta** 64 (2004) 395.

PEREIRA-FILHO, E. R.; PEREZ, C. A.; POPPI, R. J. ARRUDA, M.A.Z. Metals distribution and investigation of L'vov platform surface using principal component analysis, multi-way principal component analysis, micro synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry and scanning electron microscopy after the determination of Al in a milk slurry sample. **Spectrochimica Acta Part B** 57 (2002) 1259.

PINTO, F.G.; ANDRADA, D.; MAGALHAES, C.G.; NUNES, B.R.; DE AMORIM, F.R.; FRANCO, M.B.; SAINTPIERRE, T.; DA SILVA, J.B.B.; CURTIUS, A.J. Direct determination of selenium in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zr plus Rh treated graphite tube and co-injection of Rh as chemical modifier. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 383 (2005) 825.

PYRZYNSKA, K. Review. Determination of molybdenum in environmental samples **Analytica Chimica Acta** 590 (2007) 40.

QUINAIA, S. P.; NOBREGA, J. A. Determinação direta de crômio em açúcar e leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, 23 (2000) 185.

REBOUCAS, M. V.; FERREIRA, S.L.C.; NETO, B.B. Behavior of chemical modifiers in the determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry in petroleum products. **Talanta** 67 (2005) 195.

REID, H. J.; BASHAMMAKH, A. A; GOODALL, P. S.; LANDON, M. R.; O'CONNOR, C.; SHARP, B. L. Determination of iodine and molybdenum in milk by quadrupole ICP-MS. **Talanta** 75 (2008) 189.

REILLY, C. **Metal contamination of food**. London: Ed. Applied Science Publishers, 1980.

ROJAS, E.; HERRERA, L.A.; POIRIER, L.A.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Are metals dietary carcinogens? **Mutation Research** 443 (1999) 157.

SANTOS, L. G. C. dos; FERNANDES, E. A. de N.; BACCHI, M. A. SARRIES, G. A.; BLUMER, L. BARBOSA JUNIOR, F. Chemical composition of bovine milk from Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry** 282 (2009) 493.

SARACOGLU, S.; SAYGI K. O.; ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. **Food Chemistry** 105 (2007) 280.

SILVESTRE, M.D; LAGARDA, M.J. FARRÉ, R.; MATÍNEZ-COSTA, C.; BRINES, J. Cooper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. **Food Chemistry** 68 (2000) 95.

SOLA-LARRANAGA C, NAVARRO-BLASCO I. Preliminary chemometric study of minerals and trace elements in Spanish infant formulae. **Analytica Chimica Acta** 555 (2006) 354

TEÓFILO R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculo de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova** 29 (2006) 338.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. IUPAC. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Pure & Applied Chemistry**. 74 (2002) 835.

THOMSEN, V.; SCHATZLEIN, D.; MERCURO, D. Limits of Detection in Spectroscopy. **Spectroscopy** 18 (2003) 112.

TYLER, G. **ICP MS, or ICP AES and AAS? A comparison - ICP-MS Instruments at work**. Varian. ICP-MS 1, Abril, 1994.

VANDECASTEELE, C. **Modern Methods for trace element determination**. Chichester: Ed. John Wiley; Sons, 1993.

VOLYNSKII, A. B. Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, 58 (2003) 905.

VOLYNSKY, A. B. Comparative efficacy of platinum group metal modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B** 59 (2004) 1799.

_____. Mechanisms of action of platinum group modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B** 55 (2000) 103.

WAWSCHINEK, O.; PETEK, W.; LANG, J.; POGGLITSCH, H.; HOLZER, H. The determination of aluminum in human plasm. **Mikrochimica Acta** 1 (1982) 335.

WELZ, B., SPERLING M. **Atomic absorption spectrometry**. 3rd edition. Wiley-Vch, 1999.

WIETESKA, E.; LIÓEK, A.; DRZEWÍNSKA, A. Extraction as a method for preparation of vegetable samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 330 (1996) 251.

WOLF, R. E. **Introduction to ICP-MS. What is ICP-MS?... and more importantly, what can it do?** U.S. Geological Survey Home Page, USGS/CR/CICT, Março 2005. Disponível em <http://minerals.cr.usgs.gov/icpms/intro.html>. Data de acesso: 11/01/10.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department Of Nutrition For Health And Development. Department Of Child And Adolescent Health And Development. **The Optimal Duration Of Exclusive Breastfeeding.** Report Of An Expert Consultation. Geneva, Switzerland. 28–30 MARCH 2001. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/optimal_duration_of_exc_bfeeding_report_eng.pdf>. Acesso em 05 de janeiro de 2010.

YOSHIDA, M.; TAKADA, A.; HIROSE, J.; ENDO, M.; FUKUWATARI, T.; SHIBATA, K. Molybdenum and chromium concentrations in breast milk from 504 Japanese woman. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 72 (2008) 2247.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV edição. Brasília, Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018 p.