

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

**Silvéria Neves de Paula e Souza**

**Desenvolvimento de métodos analíticos para  
determinação de Cd, Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de  
patês por espectrometria de absorção atômica**

**Orientadora: Dra. Letícia Malta Costa  
Co-orientadora: Dra. Clésia Cristina Nascentes**

**Belo Horizonte**

**2014**

**UFMG/ICEx/DQ. 1017<sup>a</sup>**

**T. 463<sup>a</sup>**

**Silvéria Neves de Paula e Souza**

**Desenvolvimento de métodos analíticos para  
determinação de Cd, Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de  
patês por espectrometria de absorção atômica**

Tese apresentada ao Departamento  
de Química do Instituto de Ciências  
Exatas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor  
em Ciências – Química.

**Belo Horizonte**

**2014**

S719d Souza, Silvéria Neves de Paula e  
2014 Desenvolvimento de métodos analíticos para  
T determinação de Cd, Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de  
patês por espectrometria de absorção atômica  
[manuscrito] / Silvéria Neves de Paula e Souza. 2014.  
xv, 118 f. : il.

Orientadora: Letícia Malta Costa.

Coorientadora: Clésia Cristina Nascentes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais - Departamento de Química.

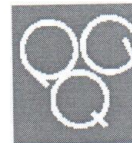
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Espectroscopia de  
absorção atômica - Teses 3. Espectroscopia de chama -  
Teses 4. Preparação de amostra (Química) - Teses. 5.  
Patês (Culinária) - Teses I. Costa, Letícia Malta,  
Orientadora II. Nascentes, Clésia Cristina,  
Coorientadora III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Cd, Cu, Fe, Pb  
e Zn em Amostras de Patês por Espectrometria de Absorção Atômica"

Silvéria Neves de Paula e Souza

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Leticia Malta Costa - Orientadora  
UFMG

Prof. Clésia Cristina Nascentes - Coorientadora  
UFMG

Prof. Maria das Graças Andrade Korn  
UFBA

Prof. Efraim Lazaro Reis  
UFV

Prof. Marcelo Martins de Sena  
UFMG

Prof. Guilherme Dias Rodrigues  
UFMG

Belo Horizonte, 28 de março de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmã e irmão por toda paciência, incentivo, orações e amor incondicional. A todos os meus familiares, em especial à minha querida madrinha Terezinha e à tia Penha, incansáveis na torcida por meu sucesso.

Às professoras Dra. Letícia e Dra. Clésia pela orientação, amizade, importantes ensinamentos e paciência durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do grupo e de laboratórios vizinhos (Rita, Aline, Leila, Frank, Luciano, Leonel, Patrícia, Deyse, Elizângela, Lívia, Luciene, Camila, Louise, Davyston, Christiane, Cristina, Rosilene, Jaqueline, Isabela, Vanessa, Júnia, Júlio, Miriany, Helvécio), por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e produtivo.

Às amigas e companheiras de laboratório Deyse, Patrícia e Elizângela pela amizade, apoio e orações.

Aos queridos Frank e Leonel pelas discussões sobre validação, pelos finais de semana produtivos de trabalho, pela amizade e parceria.

Ao Leonel por não me permitir desanimar, por ser meu maior companheiro de trabalho e amigo sempre disposto a ajudar.

À querida amiga Darliane por todo o tempo de convivência harmoniosa, risadas, e apoio nos momentos difíceis.

Ao querido amigo Keiner por todo companheirismo, carinho, atenção e ajuda.

Aos amigos da UFSCar e do Cena (USP), em especial ao Kélber, à Carla e à Lidiane, por todo o incentivo, torcida e disposição em me ajudar.

Aos professores Marcelo e Guilherme pela disponibilidade e valiosas contribuições para a melhoria do trabalho, durante a etapa de pré-banca.

Aos queridos técnicos Sandra e Gustavo pelos ensinamentos, amizade e valiosa ajuda durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Química, em especial à Paulete, ao Sr. Luiz e à Karlinha, por toda a gentileza, carinho e ajuda.

Às professoras Luiza Marilac e Maria José, minhas queridas tutoras do Reuni, pela contribuição significativa no meu aprendizado, por toda a disponibilidade e amizade.

## RESUMO

O primeiro capítulo desta tese contempla a comparação da sensibilidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação da Espectrometria de Absorção atômica com Chama – FAAS - operando nos modos monoelementar e sequencial. As determinações foram realizadas através do modo seqüencial devido aos menores tempo de análise e consumo de amostra. Em seguida, é apresentado o desenvolvimento e validação de método para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de patês. Na decomposição das amostras de patês foram avaliadas três concentrações de HNO<sub>3</sub>: 3,5; 7,0 e 14 mol L<sup>-1</sup> em associação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v v<sup>-1</sup>. Para todas as amostras a concentração de Mn ficou abaixo do limite de quantificação a técnica. O método de decomposição empregando 3,5 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v v<sup>-1</sup> foi adotado devido à maior segurança, geração de resíduos menos ácidos e obtenção de menores valores de branco analítico. Na etapa de validação avaliou-se a linearidade, seletividade, precisão, veracidade, limites de detecção e limites de quantificação para Cu, Fe e Zn, ao nível de 95% de confiança. Os limites de detecção e quantificação determinados foram 1,1 e 3,4 mg kg<sup>-1</sup> para Cu; 2,1 e 6,8 mg kg<sup>-1</sup> para Fe; 0,7 e 2,4 mg kg<sup>-1</sup> para Zn. O segundo capítulo abrange o desenvolvimento e otimização da determinação sequencial de Cd e Pb pela Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerosol Térmico - TS-FF-AAS. Foram avaliados 3 tubos atomizadores de Ni e 4 diferentes tempos de aquisição do sinal com o intuito de obter maiores sinais de absorbância, menores intervalos de tempo de *delay* e eliminação de efeitos de memória. Em seguida, foram avaliadas a linearidade, precisão e veracidade. Os limites de detecção e quantificação foram iguais a 0,05 e 1,41 mg kg<sup>-1</sup> para Cd e 0,19 e 4,7 mg kg<sup>-1</sup> para o Pb. Além disso, avaliou-se o uso de nanotubos de carbono (oxidados e não oxidados) em etapa de pré-concentração de Cd e Pb, havendo interferência dos constituintes da matriz na adsorção dos complexos de Cd-DDTP à mini-coluna preenchida com nanotubos de carbono.

## ABSTRACT

The first chapter of this thesis includes the comparison of sensitivity, precision, limit of detection and limit of quantification of Flame Atomic Absorption Spectrometry - FAAS - operating in monoelementar and sequential modes. The determinations were performed by sequentially due to lower analysis time and lower sample consumption. In the sequence, is shown the development and validation of the method for determination of Cu, Fe, Mn and Zn in pâté samples. In the decomposition of pâté samples, three concentrations of HNO<sub>3</sub> were evaluated: 3.5, 7.0 and 14 mol L<sup>-1</sup> all at 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v v<sup>-1</sup>. For all samples the Mn concentration was below the quantification limit of the technique. The method employing HNO<sub>3</sub> 3.5 mol L<sup>-1</sup> and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v v<sup>-1</sup> was adopted for the decomposition of the samples due to the security, generating less acid waste and obtaining lower values of analytical blank. In the validation step were evaluated the linearity, selectivity, precision, trueness, limits of detection and limits of quantification for Cu, Fe and Zn, at 95% confidence level. The limits of detection and the limits of quantification were 1.1 and 3.4 mg kg<sup>-1</sup> for Cu, 2.1 and 6.8 mg kg<sup>-1</sup> for Fe, 0.7 and 2.4 mg kg<sup>-1</sup> for Zn, respectively. The second chapter includes the development and optimization of the sequential determination of Cd and Pb by TS-FF-AAS. Three atomizer tubes and four times of signals acquisition were evaluated with the aim of obtaining shorter intervals of delay time and eliminating memory effects. In the sequence, the figures of merit: linearity, precision, accuracy, limits of detection and limits of quantification were evaluated. The limits of detection and quantification were equal to 0.05 and 1.41 mg kg<sup>-1</sup> for Cd, and 0.19 and 4.7 mg kg<sup>-1</sup> for Pb. The use of carbon nanotubes (oxidized and unoxidized) was evaluated for the pre-concentration step of Cd and Pb. The interference from matrix constituents in the adsorption of DDTP Cd-complexes in the mini-column filled with carbon nanotubes was observed.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Programa de aquecimento empregado na etapa de digestão em forno micro-ondas com cavidade.....	22
Figura 2. Programa de aquecimento empregado na etapa de digestão em sistema <i>ultrawave</i> de cavidade única.....	23
Figura 3. Esquema de preparo de cada uma das curvas analíticas utilizadas na avaliação da linearidade e da seletividade.....	25
Figura 4. Curvas analíticas construídas com 15 pontos e determinadas nos modos de operação do espectrômetro: 1) monoelementar e 2) seqüencial.....	29
Figura 5. Sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade única - <i>ultrawave</i> - e suporte com 5 frascos de quartzo com capacidade de 40 mL cada. ....	38
Figura 6. Digeridos de patês de fígado e presunto obtidos após etapa de digestão no <i>ultrawave</i> . ....	39
Figura 7. Gráfico de resíduos vs concentração de Cu para as curvas analíticas preparadas em: branco analítico (a e b) e em meio dos digeridos (c).....	43
Figura 8. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Cu em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Cu com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$ = valor normal esperado). ....	46
Figura 9. Curvas analíticas de Cu em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos <i>outliers</i> e verificação das premissas.....	47
Figura 10. Gráfico de resíduos vs concentração de Fe para as curvas analíticas preparadas em: branco analítico (a) e em meio dos digeridos (b e c).....	48
Figura 11. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Fe em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Fe com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$ = valor normal esperado). ....	50



Figura 12. Curvas de analíticas de Fe em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos <i>outliers</i> e verificação das premissas.....	51
Figura 13. Gráfico de resíduos vs concentração de Mn para as curvas analíticas preparadas em: branco analítico (a e b) e em meio dos digeridos (c e d). .....	52
Figura 14. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Mn em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Mn com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$ = valor normal esperado). .....	53
Figura 15. Curvas analíticas em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos <i>outliers</i> e verificação das premissas.....	54
Figura 16. Gráfico de resíduos vs concentração de Zn para curva de calibração preparada em branco analítico (a e b) e preparada em digeridos (c).....	55
Figura 17. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Zn em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Zn com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$ = valor normal esperado). .....	57
Figura 18. Curvas de analíticas de Zn em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos <i>outliers</i> e verificação das premissas.....	57
Figura 19. a) estrutura individual de grafite (grafeno) e b) estruturas de nanotubos de carbono de parede simples (SWNT) e de paredes múltiplas (MWNT).....	71
Figura 20. a) Esquema da montagem da TS-FF-AAS multielementar e b) sistema em operação com o tubo atomizador acomodado no queimador sobre o suporte de aço inox. ....	75
Figura 21. a) Suporte em aço inoxidável no qual é encaixado o tubo atomizador de Ni; b) queimador ar/acetileno do espectrômetro de chama e c) arranjo em operação, suporte encaixado no queimador do equipamento.....	76
Figura 22. Tubos atomizadores de Ni descritos na Tabela 19. ....	78

Figura 23. Em a: chegada da solução 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb ao tubo atomizador em aproximadamente 40 segundos; b: introdução de $\text{HNO}_3$ 0,01 mol $\text{L}^{-1}$ logo após a solução 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb, e retorno da linha de base a zero em aproximadamente 45 segundos. ....	87
Figura 24. DPR obtidos na determinação de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e 200 de Pb $\mu\text{g L}^{-1}$ versus tempo de aquisição do sinal analítico de 1 a 4 segundos ( $n = 3$ ). ....	89
Figura 25. Em a: Gráfico de resíduos vs concentração de Cd; b: gráfico de resíduos vs concentração de Pb para as curvas analíticas preparadas em meio ácido.....	90
Figura 26. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Cd (a) e (b) e para as curvas analíticas de Pb (c) e (d) ( $q_i =$ valor normal esperado). ....	93
Figura 27. Imagem por microscopia eletrônica de varredura para os nanotubos não modificados em magnitude de 100000 vezes. ....	95
Figura 28. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para os nanotubos não modificados.....	96
Figura 29. Em a: Curvas TG e b: curvas DTG para os nanotubos de carbono sem modificação e modificados em cada método.....	97
Figura 30. Sinais de absorvância de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd versus pH do meio para: a) método 1 de oxidação dos NTC e b) método 2 de oxidação dos NTC ( $n = 3$ ). .	99
Figura 31. Sinais de absorvância obtidos na determinação de Cd nas frações dessorvidas em cada valor de pH. ....	101
Figura 32. Em a: curva analítica de Cd não pré-concentrada e em b: curva analítica de Cd pré-concentrada. ....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros instrumentais adotados na determinação de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn por FS FAAS operando em modo sequencial ou monoelementar. ....	19
Tabela 2. Soluções padrão preparadas para avaliação da sensibilidade da técnica nos dois modos de operação do espectrômetro (n=3).....	20
Tabela 3. Soluções padrão preparadas para avaliação da precisão nos dois modos de operação do espectrômetro (n=5). ....	20
Tabela 4. Soluções padrão multielementares utilizadas na avaliação da linearidade e seletividade.....	24
Tabela 5. Soluções padrão multielementares preparadas em meio ao branco analítico para avaliação da precisão (n=7).....	26
Tabela 6. Equações de reta* das curvas analíticas multielementares determinadas nos dois modos de operação do espectrômetro de chama. ....	28
Tabela 7. Repetibilidade expressa como DPR de 5 determinações de soluções multielementares em cada modo de operação do equipamento.....	31
Tabela 8. Limites de detecção e quantificação calculados para Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn nos dois modos de operação do espectrômetro. ....	32
Tabela 9. Concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas por FS FAAS nos digeridos para os três procedimentos de digestão em forno de micro-ondas com cavidade (n=3).....	34
Tabela 10. Concentrações de Cu e Mn determinadas nas amostras de patês digeridas em <i>ultrawave</i> (n=3).....	39
Tabela 11. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Cu. ....	45
Tabela 12. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Fe.....	49
Tabela 13. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Mn. ....	52

Tabela 14. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Zn.....	56
Tabela 15. Concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas por FS FAAS nos materiais certificados de referências digeridos com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% v v <sup>-1</sup> e solução 3,5 mol L <sup>-1</sup> de HNO <sub>3</sub> (n=3). .....	58
Tabela 16. Limites de detecção e quantificação calculados para Cu, Fe, Mn e Zn. ....	59
Tabela 17. Concentrações de Fe e Zn determinadas em outras amostras de patês comerciais. ....	60
Tabela 18. Parâmetros instrumentais adotados na determinação de Cd e Pb por TS-FF-AAS operando em modo sequencial.....	74
Tabela 19. Tubos atomizadores de Ni (10 cm de comprimento) avaliados.....	78
Tabela 20. Soluções padrão Cd e Pb empregadas na construção das curvas analíticas para avaliação da linearidade. ....	79
Tabela 21. Soluções de interferentes preparadas em três níveis de concentração para avaliação do sinal de 50 µg L <sup>-1</sup> de Cd.....	84
Tabela 22. Valores de absorvância máxima, tempo de surgimento de sinal analítico distinto do sinal de ruído e tempo de retorno à linha de base para Cd e Pb em relação a cada tubo atomizador de Ni.....	85
Tabela 23. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Cd. ....	91
Tabela 24. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Pb.....	92
Tabela 25. Porcentagens de recuperação (%R) e desvio padrão relativo (de repetibilidade e precisão intermediária) em três níveis de concentração de Cd e Pb.....	94
Tabela 26. Sinais de absorvância de Cd das frações dessorvidas <i>versus</i> concentração de DDTP utilizada na complexação.....	102

Tabela 27. Sinais de absorvância obtidos na determinação de Cd nas frações desorvidas da coluna de nanotubos após passagem de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em meio aos digeridos de patê de presunto. ....	104
Tabela 28. Valores de absorvância de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd na presença de Cu, Fe e Zn como interferentes. ....	105

## LISTA DE ACRÔNIMOS

AAS	Espectrometria de absorção atômica ( <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> )
APDC	pirrolidinaditiocarbamato de amônio
BIFF-AAS	<i>Beam Injection Flame Furnace Atomic Absorption</i>
DDTP	o-o-dietilditiofosfato de amônio
DPR	Desvio padrão relativo
DWCNT	Nanotubos de carbono de parede dupla ( <i>Double walled carbon nanotubes</i> )
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama ( <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> )
FS FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama no modo sequencial rápido ( <i>Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometry</i> )
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite ( <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High Pressure liquid chromatography</i> )
HR-CS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua ( <i>High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i> )
ICP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado ( <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> )
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ( <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
LPAT	Técnica de absorção em caminho longo ( <i>Long-path absorption technique</i> )
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MEV	Microscopia eletrônica de varredura ( <i>Scanning electron microscopy</i> )
MMQO	Método de mínimos quadrados ordinários
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas ( <i>Multi walled carbon nanotubes</i> )
NTC	Nanotubos de carbono
s	Desvio padrão
STAT	Armadilha de átomos em tubo de quartzo com fenda ( <i>Slotted quartz tube atom trap</i> )
STPF	Temperatura estabilizada da plataforma do forno ( <i>Stabilized Temperature Platform Furnace</i> )
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede única ( <i>Single walled carbon nanotubes</i> )
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão ( <i>transmission electron microscopy</i> )
TG	Termogravimetria
TS-FF-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno tubular na Chama e Aerossol Térmico ( <i>Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> )
WCAT	Armadilha de átomos resfriada com água ( <i>Water-cooled atom trap</i> )

# SUMÁRIO

**Capítulo 1. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de patês por FS FAAS, digeridas com soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> em forno de micro-ondas com cavidade.**

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Espectrometria de absorção atômica com chama .....	4
3.2. Importância da determinação elementar em alimentos.....	8
3.3. Decomposição das amostras assistida por radiação micro-ondas.....	10
3.4. Procedimento de validação de métodos analíticos .....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1. Amostras, reagentes e materiais de referência certificados.....	17
4.2. Equipamentos e acessórios .....	18
4.3. Avaliação dos modos de operação do espectrômetro de absorção atômica com chama: modos monoelementar e sequencial .....	19
4.4. Liofilização, moagem e estocagem das amostras de patês .....	21
4.5. Avaliação da eficiência de soluções diluídas de HNO <sub>3</sub> empregadas na etapa de decomposição das amostras de patês .....	21
4.6. Procedimento de validação do método envolvendo a digestão dos patês com HNO <sub>3</sub> 3,5 mol L <sup>-1</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% v v <sup>-1</sup> e posterior determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FS FAAS.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1. Avaliação dos modos de operação do espectrômetro de absorção atômica com chama: modos monoelementar e sequencial .....	27



5.2. Avaliação da eficiência de soluções diluídas de HNO <sub>3</sub> empregadas na etapa de decomposição das amostras de patês .....	33
5.3. Procedimento de validação do método envolvendo a digestão dos patês com HNO <sub>3</sub> 3,5 mol L <sup>-1</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% v v <sup>-1</sup> e posterior determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FS FAAS.....	40
5.3.1. Linearidade e seletividade .....	40
5.3.2. Precisão e veracidade .....	58
5.3.3. Limites de detecção e quantificação .....	59
5.4. Aplicação do método analítico a outras amostras de patês .....	59
6. CONCLUSÕES .....	61

**Capítulo 2 – Desenvolvimento de método de determinação sequencial de Cd e Pb em amostras de patês por TS-FF-AAS e avaliação da utilização de nanotubos de carbono de parede múltipla em etapa de pré-concentração dos analitos**

7. INTRODUÇÃO .....	63
8. OBJETIVOS .....	65
8.1. Objetivo Geral .....	65
8.2. Objetivos Específicos.....	65
9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	66
9.1. Alguns arranjos instrumentais desenvolvidos para melhorar a sensibilidade da FAAS .....	66
9.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico (TS-FF-AAS) e algumas estratégias de pré-concentração dos analitos envolvendo agentes complexantes .....	69
9.3. Nanotubos de carbono como adsorvente na extração em fase sólida... ..	70
10. MATERIAL E MÉTODOS .....	73

10.1. Amostras e reagentes utilizados .....	73
10.2. Equipamentos e acessórios .....	74
10.3. Avaliação do tubo atomizador de Ni e tempo de atraso assumido entre determinações subsequentes .....	77
10.4. Avaliação do intervalo de tempo de aquisição do sinal analítico.....	79
10.5. Avaliação das figuras de mérito: linearidade, veracidade, limite de detecção e limite de quantificação. ....	79
10.6. Procedimentos de oxidação dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e avaliação da eficiência de extração de Cd e Pb .....	81
10.7. Avaliação da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas oxidados em etapa de pré-concentração de Cd e Pb e posterior determinação por TS-FF-AAS.....	82
10.8. Avaliação da utilização de nanotubos não oxidados em etapa de pré-concentração de Cd na forma de complexos Cd-DDTP .....	82
10.9. Emprego do procedimento de pré-concentração dos complexos de Cd-DDTP em mini-coluna com nanotubos não oxidados .....	83
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
11.1. Avaliação do tubo atomizador de Ni e tempo de atraso assumido entre determinações subsequentes .....	84
11.2. Avaliação do intervalo de tempo de aquisição do sinal analítico.....	88
11.3 Avaliação de algumas figuras de mérito: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), veracidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	89
11.4. Avaliação de procedimentos de pré-concentração de Cd e Pb utilizando colunas preenchidas com nanotubos oxidados e não oxidados .....	95
12. CONCLUSÕES .....	106
13. REFERÊNCIAS.....	108

# **Capítulo 1. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de patês por FS FAAS após digestão assistida por radiação micro-ondas empregando soluções diluídas de HNO<sub>3</sub>**

## **1. INTRODUÇÃO**

Os hábitos alimentares estão intimamente relacionados com a qualidade de vida de um indivíduo, afetando diretamente sua saúde e seu desenvolvimento, já que os alimentos fornecem energia necessária ao crescimento e manutenção do corpo humano (Neutzling *et al.*, 2010; Velásquez-Meléndez, 1997). Contudo, os alimentos também são a principal fonte de exposição a metais tóxicos, não só porque alguns destes são seus constituintes naturais, mas também por causa da contaminação ambiental e do processamento industrial (Vieira *et al.*, 2011).

Mudanças significativas estão ocorrendo nos hábitos alimentares da população, especialmente a substituição de alimentos caseiros e naturais por alimentos industrializados, estimulado principalmente pela influência do mercado publicitário, do ritmo acelerado de vida das grandes cidades e do desenvolvimento econômico e social, que ampliou o acesso efetivo aos alimentos prontos para consumo (Toloni *et al.*, 2011).

A carne e os produtos cárneos são fontes de elementos essenciais requeridos na dieta humana, como Fe e Zn (Demirezen, 2006). A inocuidade e a qualidade nutricional dos produtos cárneos são importantes objetivos do serviço de fiscalização de alimentos, porque tais produtos são de consumo popular no Brasil (Daguer *et al.*, 2011).

Dentre os produtos prontos para consumo, facilmente encontrados em supermercados e bastante consumidos no país estão os patês, que são obtidos a partir de carnes e/ou produtos cárneos e/ou miúdos comestíveis, de diferentes espécies de animais, transformados em pasta, adicionados de ingredientes e submetidos a um processo térmico adequado (MAPA, 2000).

Ainda que amplamente consumidos, não há no Brasil uma legislação específica que contemple os limites máximos de micronutrientes nesses alimentos. Em 2011 foi publicado o regulamento técnico do MERCOSUL sobre os limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Esse regulamento contempla os limites de Cd e Pb em carnes de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral, sendo iguais a 0,1 e 0,05 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Quando se trata de amostras de fígado desses animais, os limites são iguais a 0,5 mg kg<sup>-1</sup> para Cd e Pb, já que se trata de um órgão reconhecidamente acumulador de toxinas (MERCOSUL, 2011).

Estudos relacionados à transferência de contaminantes químicos dentro da cadeia alimentar fornecem informações para o desenvolvimento de programas de vigilância, destinados a melhorar a segurança no abastecimento de alimentos e minimizar a exposição de humanos a agentes tóxicos. Nesse contexto, a química analítica é ferramenta importante na elaboração e atualização dos programas e legislações de alimentos, uma vez que são desenvolvidos procedimentos que fornecem informações sobre a composição elementar e espécies químicas presentes em diferentes tipos de alimentos (Korn *et al.*, 2008).

A Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) é uma das técnicas mais utilizadas para determinação elementar em amostras de alimentos. Espectrômetros de absorção atômica com chama estão disponíveis comercialmente desde 1962 e são largamente utilizados em laboratórios industriais e de pesquisas. Não é raro encontrarmos equipamentos que operam em adequadas condições de repetibilidade e robustez há mais de 20 anos. Desse modo, o uso de espectrômetro de chama que permite a determinação sequencial, disponibilizado apenas por um fabricante, não é tão disseminado quanto o convencional. Há ainda laboratórios que já possuem espectrômetros sequenciais, mas os usuários continuam a utilizá-lo da forma convencional, seja por falta de treinamento para usar o *software*, seja por costume em trabalhar de maneira monoelementar.

Para que se proceda a tais determinações, em geral, é empregada uma etapa prévia de decomposição em que as amostras são convertidas em soluções representativas (Demirel *et al.*, 2008).

Este capítulo contemplará uma comparação entre algumas figuras de mérito tais como sensibilidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção e limite de quantificação, calculadas a partir dos dados obtidos em dois modos de operação do espectrômetro de absorção atômica com chama: modos monoelementar (convencional) e sequencial (determinação sequencial dos analitos). Em seguida, será apresentado o desenvolvimento de um método analítico para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de diferentes patês. As concentrações de Mn foram inferiores ao limite de quantificação da técnica em todas as amostras de patês consideradas. Na etapa de preparo de amostras foram avaliados três procedimentos de digestão em forno de micro-ondas com cavidade. Na etapa de validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, seletividade (efeito de matriz), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), veracidade, limite de detecção e limite de quantificação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar um método analítico para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FS FAAS em amostras de patês, digeridas em forno de micro-ondas com cavidade empregando  $H_2O_2$  e soluções diluídas de  $HNO_3$ .

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar os dois modos de operação do espectrômetro com chama (monoelementar e sequencial) através da comparação da sensibilidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção e limite de quantificação.

- Avaliar a eficiência de soluções diluídas de  $\text{HNO}_3$  na digestão de amostras de patês em forno de micro-ondas com cavidade.
- Validar o método desenvolvido através da avaliação das figuras de mérito: linearidade, seletividade (efeito de matriz), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), veracidade, limite de detecção e limite de quantificação, seguindo as recomendações dispostas nos guias de validação da IUPAC (Thompson *et al.*, 2002), do INMETRO (INMETRO,2011) e procedimentos descritos na literatura (Souza & Junqueira, 2005).
- Aplicar o método validado na análise de diferentes amostras de patês.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Espectrometria de absorção atômica com chama**

Os estudos precursores sobre a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) foram realizados a partir de 1955, quando independentemente, Alan Walsh na Austrália e Alkemade e Milatz na Holanda publicaram o conceito de absorção atômica enquanto técnica analítica. Entretanto, Walsh é considerado o “inventor” da técnica por seu constante empenho e esforço para torná-la aplicável a análises de rotina e aceita pela comunidade científica da época (Slavin, 1991; Walsh, 1955).

Dentre as maiores contribuições de Walsh está o uso de lâmpadas de cátodo oco, construídas em seu próprio laboratório, como fontes de radiação compatíveis com a resolução dos monocromadores da época. As fontes contínuas, apesar de apresentarem a vantagem de emitir radiação nas regiões do ultravioleta e visível, eram limitadas, pois a largura da banda isolada com monocromadores de baixa resolução era maior do que as obtidas com fontes de linha. Esta largura de banda acarretaria diminuição de sensibilidade, curvas de calibração não lineares, maior susceptibilidade à radiação de fundo e limites de detecção relativamente mais elevados (Lowe e Sullivan, 1999; Amorim *et al.*, 2008). Além disso, Walsh também propôs o uso de um queimador de pré-

mistura (originalmente projetado por Lundegardh, na Suécia) utilizado para chama ar-propano ou ar-acetileno (Slavin, 1991; Welz e Sperling, 1999).

Ainda assim, devido à falta de componentes eletrônicos adequados, a técnica de absorção atômica só foi amplamente empregada a partir de 1960. Até então, os pesquisadores desenvolveram métodos de emissão atômica, baseados nos experimentos de Bunsen e Kirchoff, que identificaram em 1860, Fe, Cu, Pb, Na e K em amostras de minério empregando o bico de Bunsen. Essa histórica demonstração de emissão atômica despertou o interesse de outros pesquisadores, principalmente de indústrias metalúrgicas, que desenvolveram métodos para determinação de metais baseados na emissão atômica (Okumura *et al.*, 2004; Welz & Sperling, 1999; Amorim *et al.*, 2008).

É importante mencionar que o cientista russo Boris L'vov propôs em 1961, um espectrômetro de absorção atômica em que o atomizador não era uma chama, mas sim um tubo de grafite, marcando o início da Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (G FAAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), com significativa redução dos limites de detecção (L'vov, 1961).

A partir da definitiva aceitação da espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) alguns avanços contribuíram para o aumento de sua popularidade e utilização, especialmente o uso da câmara de pré-mistura acoplada aos queimadores dos espectrômetros com chama, lâmpadas de cátodo oco multielementares (nas quais os elementos combinados nas lâmpadas não apresentem interferências espectrais entre si) e a introdução do conceito STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*) por Slavin e colaboradores (Welz e Sperling; 1999).

O crescente interesse por utilizar a técnica ficou evidenciado não só pelo aumento do número de publicações mas principalmente pelo expressivo número de laboratórios de pesquisa e industriais que adquiriram este equipamento (Welz & Sperling, 1999; Sneddon *et al.*, 1993). A FAAS é uma técnica presente em quase todos os laboratórios de pesquisa e de prestação de serviço que realizam determinação de metais em diversas amostras, tais como alimentos, bebidas, sedimentos, solos, materiais biológicos e outros (Bings *et al.*, 2010).

Este fato se deve à sua elevada robustez, seletividade e facilidade de operação. Soma-se a isso o reduzido número de linhas espectrais, que acarreta menor possibilidade de interferência por sobreposição. É importante ressaltar também os menores custos de aquisição e manutenção se comparada a outras técnicas, especialmente à Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) e à Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) (Welz e Sperling, 1999; Vandecasteele e Block, 1997).

Quanto à sensibilidade para determinação de elementos na faixa de concentração de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a FAAS é limitada por alguns fatores como: processos de absorção, emissão e espalhamento de radiação pelos constituintes da chama, diluição da nuvem atômica nos gases da chama e formação de carbetos e óxidos estáveis. Entretanto, as principais limitações da técnica quanto à sensibilidade são a rápida e contínua passagem dos átomos pela zona de medida e o fato de o aerossol que alcança a chama conter aproximadamente 5 % do volume da solução inicialmente aspirada, ou seja, baixa eficiência no processo de nebulização.

Além disso, o modo monoelementar de operação do equipamento é reconhecidamente a limitação mais severa da técnica, tornando a frequência analítica da técnica inferior quando comparada a técnicas multielementares como ICP OES (Bings *et al.*, 2010; Sneddon *et al.*, 1993).

Em espectrômetros com chama convencionais os parâmetros do equipamento, tais como altura do queimador e feixes de radiação da lâmpada de cátodo oco e da lâmpada de deutério usada na correção de radiação de fundo, são ajustados para a determinação do analito de interesse. Para se determinar outro elemento, os parâmetros mencionados são novamente ajustados e todas as soluções são novamente analisadas. Isso aumenta o tempo de análise e dependendo do número de elementos que se deseja determinar o consumo de amostras será significativo.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da FAAS, vários pesquisadores se empenharam em desenvolver em seus próprios laboratórios, arranjos que permitissem o aumento do tempo de residência dos átomos no



caminho óptico, e o aumento do volume de amostra aspirada que chega ao atomizador (Matusiewicz, 1997).

Algumas opções comerciais foram apresentadas com o objetivo de aumentar o desempenho dos instrumentos de absorção atômica, superando seu caráter monoelementar. Estão comercialmente disponíveis equipamentos que permitem a determinação elementar simultânea como no caso da Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS, do inglês *High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*), disponíveis com atomizadores de chama ou eletrotérmicos (Amorim *et al.*, 2008).

A Espectrometria de Absorção Atômica com Chama Sequencial (FS FAAS) mantém as vantagens da FAAS convencional, tais como simplicidade, seletividade, robustez e custo relativamente baixo de aquisição e manutenção do equipamento, porém com a vantagem da determinação multielementar (Amorim e Ferreira, 2005; Dionísio *et al.*, 2011).

Nos espectrômetros de absorção atômica com chama que operam em modo sequencial, as lâmpadas de cátodo oco são operadas simultaneamente e selecionadas através de um espelho motorizado. A determinação dos elementos é realizada em ordem decrescente de seus comprimentos de onda em um monocromador de varredura. Isso diminui o tempo de análise e o consumo de reagentes e amostras (Miranda e Pereira-Filho, 2009). Projahn e colaboradores avaliaram a utilização de Au como padrão interno para determinação multielementar sequencial de Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras minerais. Dessa forma, além do ganho em frequência analítica, o modo sequencial da FAAS possibilita o uso de padrão interno que corrige erros devidos à etapa de preparo de amostras e melhora a precisão das análises. O emprego de padrão interno não é possível no arranjo convencional da FAAS, uma vez que tal elemento deve ser medido ao mesmo tempo ou imediatamente após os analitos de interesse (Projahn *et al.*, 2004).

### 3.2. Importância da determinação elementar em alimentos

A alimentação é a principal via de entrada de elementos essenciais no organismo humano; seguida da água e do ar. O alimento fornece energia para todas as funções vitais do organismo e também dá sustentabilidade para o crescimento do corpo humano e para sua manutenção. Informações sobre a distribuição elementar nos alimentos são importantes e necessárias para estimar a absorção de elementos essenciais e para avaliar os potenciais riscos à saúde causados pela exposição a elementos tóxicos (Cozzolino, 2005).

A carne e os produtos cárneos são fontes de elementos essenciais requeridos na dieta humana, sendo considerados indispensáveis por consumidores e nutricionistas em uma dieta equilibrada (Demirezen, 2006). Sua composição é altamente variável, dependendo do tipo de animal, dos cortes da carne e da quantidade e tipo dos demais ingredientes utilizados na formulação do produto. As carnes são boas fontes de Fe que está presente na forma heme (ligado à hemoglobina), o qual é mais bem absorvido do que o Fe não heme, proveniente dos alimentos de origem vegetal, ovos, leite e derivados (Pedro *et al.*, 2000).

O patê é um produto cárneo industrializado obtido a partir de carnes e/ou produtos cárneos e/ou miúdos comestíveis, das diferentes espécies de animais transformados em pasta, adicionado de ingredientes e submetido a um processo térmico adequado (MAPA, 2000).

O Ministério da Agricultura publicou em 2000 um regulamento técnico de qualidade e identidade de patês, preconizando limites para carboidratos totais (máximo de 1-10%), amido (máximo de 1-10%), umidade (máximo de 70%), gordura (máximo de 32%), proteína (mínimo de 8%) (MAPA, 2000).

Entretanto, não há legislação específica para produtos cárneos do tipo patês que preconize os níveis máximos tolerados de micronutrientes essenciais e elementos tóxicos. Para produtos cárneos, foi elaborado em 2011 o regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Nesta publicação, os limites máximos em diferentes tipos de carnes e miúdos são 0,5 - 1,0 mg kg<sup>-1</sup> para As, 0,1 - 0,5 mg kg<sup>-1</sup> para Pb e de 0,05 - 0,5 mg kg<sup>-1</sup> para Cd. No caso de peixes crus, congelados ou

refrigerados os limites máximos para As, Pb, Cd e Hg são 1; 0,3; 0,05 e 0,5 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (MERCOSUL, 2011).

Dentre os elementos presentes na dieta dos seres humanos, apenas um reduzido número é considerado essencial para a manutenção dos processos vitais. Um consumo inadequado de qualquer desses nutrientes essenciais pode resultar em lesões às células do corpo, surgindo sintomas clínicos característicos que em muitos casos desaparecem ou são amenizados quando a deficiência ou o excesso é corrigida (o) (Reilly, 2002).

Cobre, Fe, Mn e Zn são considerados essenciais, e a deficiência nutricional dos mesmos provoca dificuldades de aprendizagem em crianças, aumento da taxa de mortalidade e menor produtividade do trabalhador (Cozzolino, 2005).

O Cu é um elemento essencial amplamente distribuído nos alimentos, sendo suas principais fontes, fígado, ostras, castanhas, chocolates e outros. A sua deficiência séria pode causar a síndrome de Menkes, caracterizada por uma falha na absorção intestinal desse elemento. Um erro congênito relacionado ao excesso de Cu no metabolismo pode levar à doença de Wilson havendo um defeito na excreção de Cu pela bile, ocasionando maior acúmulo nos tecidos (Cozzolino, 2005).

O Fe é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre e participa da formação de uma série de enzimas. Ele é encontrado em carnes vermelhas e vísceras, melado, vegetais e feijão (Lobo e Tramonte, 2004).

Quando a quantidade mínima de Fe que deve ser ingerida não é alcançada, a doença mais comumente manifestada é a anemia. Sua deficiência também pode causar partos prematuros, bebês com baixo peso, além do hipodesenvolvimento físico e mental (WHO, 2001).

O Zn está presente em mais de 300 enzimas, sendo encontrado em carnes, organismos marinhos (ostras e camarões), grãos integrais, castanhas, cereais, legumes e tubérculos. A deficiência desse elemento pode acarretar alterações neurossensoriais, anorexia, mortalidade materna e parto prematuro, depressão, baixa estatura, cegueira noturna e fotofobia (Christos *et al.*, 2011).

O Mn é um elemento traço com funções enzimática e estrutural e os alimentos representam sua principal fonte de ingestão. Se quantidades

exageradas desse elemento são ingeridas podem ocorrer danos aos sistemas nervoso, respiratório, cardíaco e reprodutivo (Silva *et al.*, 2006).

Elementos como Hg, Cd e Pb, ainda que presentes em concentrações extremamente baixas desempenham papel altamente tóxico para o homem. O Cd é um elemento relativamente raro, que não é encontrado em estado puro na natureza e sim associado a sulfetos em minérios de Zn, Pb e Cu. O envenenamento agudo causado por esse elemento pode levar à pressão alta, danos aos rins, destruição do tecido testicular e das células vermelhas do sangue. A longa exposição a Cd pode provocar distúrbios no metabolismo do Ca, osteoporose e osteomalácia (Vather *et al.*, 2007).

O Pb tem como principais fontes naturais emissões vulcânicas e intemperismo geoquímico, sendo o mineral galena a sua fonte primária. Em populações não expostas ao metal, os alimentos representam a maior fonte desse elemento. Os principais alimentos a serem considerados são frutas, vegetais folhosos, cereais, rins, moluscos (particularmente mexilhão), e vinho (contaminado na fase de produção). No passado, as latas com soldas de Pb, usadas na embalagem de alimentos eram uma significativa fonte de exposição a Pb (Baird, 2002). A cronicidade de exposição a esse elemento pode gerar distúrbios gastrointestinais, alterar a pressão arterial, afetar negativamente o fígado e o sistema renal (Schifer *et al.*, 2005).

### **3.3. Decomposição das amostras assistida por radiação micro-ondas**

A determinação de traços de metais em alimentos por espectrometria de absorção atômica envolve na maioria dos casos, o emprego de uma etapa prévia de decomposição em que as amostras são convertidas em soluções representativas (Demirel *et al.*, 2008; Korn *et al.*, 2008).

Essa etapa é a mais crítica de toda a sequência analítica, sendo dependente do analito e de suas concentrações, da complexidade da matriz, do tamanho de partícula requerido, da técnica utilizada para a determinação dos elementos e da veracidade e exatidão requeridas (Bader & Zimmermann, 2012; Krug, 2010).

Assim, é imprescindível o desenvolvimento de novos métodos e aperfeiçoamento dos métodos de preparo de amostras já existentes, através

dos quais os analitos possam ser disponibilizados para determinação em menor tempo, minimizando os riscos de contaminação e perda, gasto de reagentes e geração de resíduos (Oliveira, 2003; Krug, 2010).

Os procedimentos convencionais de digestão por via úmida podem ser realizados em frascos abertos, aquecidos em chapa de aquecimento ou blocos digestores (Oliveira, 2003). Os métodos de decomposição em sistemas abertos não são recomendados quando o objetivo é a determinação de elementos que podem ser perdidos completa ou parcialmente por volatilização tais como arsênio, antimônio, mercúrio e selênio (krug, 2010; Vandecasteele e Block, 1997). Esses métodos apresentam maior frequência analítica se comparados àqueles realizados em fornos de micro-ondas, nos quais é utilizado um menor número de frascos e estes, devem passar por uma rodada de limpeza antes de sua reutilização.

Os procedimentos de decomposição de amostras realizados em fornos de micro-ondas apresentam como vantagens a redução do tempo de solubilização e também do volume de reagentes utilizados. Além disso, são procedimentos mais seguros para o analista em relação aos realizados em sistemas abertos (Bressani *et al.*, 2006).

Os sistemas fechados (fornos de micro-ondas com cavidade) apresentam-se limitados em relação à massa de amostra utilizada na decomposição, que deve ser inferior a 500 mg e a 1 g para amostras orgânicas e inorgânicas, respectivamente. Tais limites são impostos em função da pressão interna que se desenvolve dentro do frasco reacional, a qual é dependente do somatório da pressão de vapor do ácido utilizado e da pressão resultante dos produtos gasosos gerados nas reações de decomposição (Lamble e Hill, 1998; Kingston e Haswel, 1997).

A energia micro-ondas é uma radiação eletromagnética não ionizante, que causa movimento das espécies em solução, pela migração de íons e também pela rotação de dipolos. Com a aplicação do campo eletromagnético ocorrerá o fenômeno de migração iônica, o qual será dependente da mobilidade do íon, bem como de sua carga e concentração no meio reacional. A resistência da solução a essa condução de íons produzirá calor, havendo, portanto, aumento de temperatura (Anwar *et al.*, 2011).

O fenômeno de rotação de dipolos ocorrerá quando as moléculas que possuírem dipolos se alinharem devido à interação com o campo eletromagnético aplicado. Quando da aplicação desse campo, as moléculas com momentos de dipolo diferentes de zero tenderão a se alinhar e, ao cessar a aplicação do campo, elas retornarão ao seu estado inicial desordenado, havendo dissipação de calor para o meio reacional (Anwar *et al.*, 2011; Harahsheh e Kingman, 2004). Tal fenômeno é dependente da frequência do campo eletromagnético e do tempo que os dipolos gastam para retornar ao seu estado de desordem inicial (Fortuny *et al.*, 2008).

A primeira utilização da radiação micro-ondas na área de preparo de amostras ocorreu em 1975 com Abu-Samra e colaboradores (Abu-Samra *et al.*, 1975). Desde então, a utilização de fornos micro-ondas em laboratórios cresceu exponencialmente e sua ampla aceitação para o preparo de amostras em química analítica foi comprovada por Kingston e Haswel em abrangente obra sobre o assunto. É importante ressaltar que a eficiência da conversão de energia micro-ondas é medida através do fator de dissipação ( $\tan \delta$ ), dado pela equação:

$$\tan \delta = \varepsilon''/\varepsilon' \text{ (equação 1);}$$

onde  $\varepsilon'$  representa a constante dielétrica e  $\varepsilon''$  representa o fator de perda, característicos de cada substância. Quanto maior o valor de  $\tan \delta$ , maior será a absorção da radiação micro-ondas (Kingston e Haswel, 1997).

Em sistemas fechados que empregam a radiação micro-ondas para decomposição das amostras, o HNO<sub>3</sub> concentrado é o ácido mais utilizado por ser de simples manipulação, facilmente purificado e possuir boa capacidade para oxidar compostos orgânicos em amostras biológicas (Araújo *et al.*, 2002). Nesses sistemas, o ácido nítrico tem seu ponto de ebulição aumentado de 120 °C para aproximadamente 170 °C, o que aumenta seu poder oxidante e potencializa a decomposição de amostras orgânicas. Além disso, a alta pressão alcançada dentro dos frascos potencializa a ação oxidativa do HNO<sub>3</sub>, ainda que esse reagente não seja usado em altas concentrações (Smith e Arsenault, 1996).

Quando as amostras são decompostas empregando-se soluções diluídas de HNO<sub>3</sub>, em fornos de micro-ondas que não possuem sistema

despressurização com O<sub>2</sub>, é recorrente o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante auxiliar. A eficiência de soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> na decomposição de amostras tais como plantas, café, amostras bovinas (músculo, sangue e vísceras), soja e patês se deve ao processo de regeneração do ácido nítrico, que sofre decomposição térmica produzindo diferentes óxidos solúveis em água, com características oxidantes (Araújo *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013).

Quando se utiliza o ácido nítrico concentrado, NO<sub>2</sub> é o principal produto de reação. Entretanto, durante a oxidação da matéria orgânica com soluções diluídas desse ácido haverá produção preferencial de NO, que reage com o O<sub>2</sub> presente na fase gasosa e produz NO<sub>2</sub>. O NO<sub>2</sub> pode ser reabsorvido na fase aquosa e por meio de uma reação de desproporcionamento serão produzidos HNO<sub>3</sub> e HNO<sub>2</sub>. Tal ciclo se repetirá até o completo consumo do O<sub>2</sub> presente na fase gasosa sendo, portanto, dependente do volume de O<sub>2</sub> dentro do frasco de reação (Castro *et al.*, 2009; Bizzi *et al.*, 2010).

Nesse contexto, Bizzi e colaboradores (2010) avaliaram o aumento da eficiência de soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> quando o volume de O<sub>2</sub> dentro dos frascos reacionais foi aumentado, através da pressurização com O<sub>2</sub>, sem utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como reagente oxidante auxiliar. Os autores obtiveram eficiente digestão de 100 mg de fígado bovino quando empregada uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> e pressurização dos frascos com 2 MPa de O<sub>2</sub>. O conteúdo de carbono residual nesse caso foi de 7,5%, similar ao obtido quando empregadas soluções mais concentradas do ácido (7 mol L<sup>-1</sup>) (Bizzi *et al.*, 2010).

### **3.4. Procedimento de validação de métodos analíticos**

A validação é uma ferramenta utilizada para demonstrar que um método específico de análise mede o que se propõe a medir e, portanto, é adequado à sua finalidade. Tal ferramenta é requerida para qualquer novo método, incluindo-se métodos já estabelecidos e anteriormente validados e métodos que tenham o escopo ampliado (Taverniers *et al.*, 2004; ABNT, 2005).

Na literatura é possível encontrar alguns guias internacionais que descrevem o procedimento de validação de métodos analíticos. No Brasil, o

principal guia utilizado para validação de métodos de ensaios químicos é o DOQ-CGCRE-008, publicado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2011). Para resíduos e contaminantes em alimentos, é importante mencionar o manual de garantia da qualidade analítica, publicado em 2011 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

Na prática, o procedimento de validação consistirá em documentar a qualidade de um método analítico, através da avaliação de alguns parâmetros de mérito, tais como seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, veracidade, dentre outros (Souza e Junqueira, 2005).

O preparo de amostras é de fundamental importância para um procedimento de validação bem sucedido e, portanto, devem ser considerados os analitos de interesse e suas faixas de concentração, a complexidade da matriz e as técnicas analíticas empregadas (Massart *et al.*, 1997; Souza e Junqueira, 2005).

A linearidade diz respeito à capacidade do método de fornecer respostas instrumentais que sejam proporcionais à concentração do analito dentro uma faixa de concentração especificada. A avaliação da linearidade deve ir além da consideração apenas dos coeficientes de correlação ( $r$ ) e determinação ( $R^2$ ) (RSC, 2005; Araujo, 2009).

Ao se utilizar mais de dois padrões é necessário proceder a uma regressão do tipo linear ou quadrática. O método estatístico mais comumente empregado na etapa de calibração é o método de mínimos quadrados ordinários - MMQO - sendo representado pela equação  $y = a+bx+e_i$ , em que  $y$  representa a resposta instrumental,  $x$  representa a concentração das soluções padrão utilizadas,  $a$  e  $b$  são os parâmetros estimados da equação (intercepto e coeficiente angular, respectivamente) e  $e_i$  representa os resíduos da regressão (Charnet *et al.*, 2008).

Após estimar os parâmetros da regressão, recomenda-se que, além da inspeção visual dos gráficos  $x$ - $y$  e dos resíduos da regressão, sejam empregados testes estatísticos formais de modo a checar as premissas relacionadas à normalidade, independência, e homoscedasticidade dos dados e também à exclusão de valores extremos (*outliers*) (Souza e Junqueira, 2005; MAPA, 2011).



O guia de validação do INMETRO propõe a detecção e exclusão de valores discrepantes (*outliers*) para cada nível de concentração, a verificação da homoscedasticidade dos dados e a adequação da reta gerada ao modelo matemático (INMETRO, 2011).

Souza (2007) descreveu de forma abrangente os testes estatísticos referentes à verificação de premissas relacionadas à normalidade, independência, homoscedasticidade dos resíduos, exclusão de *outliers*, significância da regressão e possíveis desvios da linearidade (Souza, 2007).

A avaliação da seletividade fornece a capacidade do método analítico em superar as interferências dos componentes da matriz da amostra no sinal do analito. O aumento ou redução do sinal do analito em função dos componentes da matriz acarretará modificação no intercepto e no coeficiente angular da equação obtida para a curva analítica. Uma das formas de se avaliar a seletividade é através do estudo de efeitos de matriz (Vessman *et al.*, 2001; Souza, 2007).

A avaliação da precisão consiste em expressar numericamente o grau de dispersão de um conjunto de medidas em relação à média das mesmas, em geral, através do desvio padrão ou desvio padrão relativo (também chamado de coeficiente de variação) (Araujo, 2009). Três níveis de precisão são usualmente definidos: a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade. A repetibilidade é avaliada sob condições de medições repetidas do mesmo procedimento, pelos mesmos operadores, utilizando o mesmo instrumento de medição, sob as mesmas condições operacionais, no mesmo local por um curto período de tempo (INMETRO, 2012). Quando uma das condições é variada, por exemplo, medidas em diferentes dias, o desvio padrão relativo expressará a precisão intermediária do método (Thompson *et al.*, 2002).

É importante salientar que o número de replicatas para cada nível de concentração deve expressar a rotina do laboratório e que só é possível estimar a reprodutibilidade de um procedimento analítico por meio da participação em um ensaio interlaboratorial (INMETRO, 2011).

A veracidade de um método está relacionada à concordância entre resultados obtidos através do método proposto e os valores de referência, aceitos como verdadeiros. Para tal avaliação podem ser utilizados materiais de

referência certificados, a comparação entre os resultados obtidos a partir do método em desenvolvimento e um método normalizado e, em último caso, a porcentagem de recuperação obtida a partir de adições conhecidas do analito à matriz branca. A avaliação da veracidade deve, sempre que possível, ser realizada utilizando-se materiais de referência certificados, que possuam matrizes próximas das matrizes das amostras estudadas. Tais materiais são submetidos ao método analítico proposto, sendo efetuados testes estatísticos ( $t$  e  $F$ ) para verificar se há diferenças significativas entre as concentrações determinadas e as certificadas. Caso não haja disponibilidade de tais materiais e tampouco um método normalizado para comparação, a veracidade pode ser avaliada através de experimentos de adição/recuperação em que concentrações conhecidas do analito são adicionadas às amostras, sendo a resposta avaliada nesse caso como porcentagem de recuperação (MAPA, 2011).

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia, publicado em 2012, o termo exatidão refere-se ao conjunto formado pela veracidade e precisão (INMETRO, 2012).

Segundo o guia da IUPAC (Thompson *et al.*, 2002) para validação intralaboratorial, o limite de detecção se refere à menor concentração do analito em uma amostra que pode ser confiavelmente distinguida do zero. Já o limite de quantificação se refere à concentração abaixo da qual não é possível fazer determinações do analito com precisão e veracidade aceitáveis. O guia de validação do INMETRO (2011) recomenda que um mínimo de 7 replicatas sejam empregadas para determinação dos limites e que, no caso de análise em nível de traços, é aconselhável adotar a concentração mais baixa da curva analítica como o limite de quantificação. (MAPA, 2011).

Diante das informações expostas até aqui, este capítulo apresenta uma breve comparação entre alguns parâmetros de mérito tais como sensibilidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação da técnica de absorção atômica com chama, quando operada em modo monoelementar (convencional) e modo multielementar sequencial. Em seguida, é apresentado um método analítico para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de diferentes patês (atum, fígado, frango, peito de peru e presunto). Foi avaliada a eficiência de soluções diluídas de  $\text{HNO}_3$  empregadas na etapa de digestão das amostras

e a necessidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante auxiliar. A validação do método proposto foi baseada principalmente nas recomendações presentes nos guias do INMETRO e da IUPAC.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostras, reagentes e materiais de referência certificados**

As amostras de patês de atum, frango, fígado, peito de peru e presunto foram compradas em supermercados, levando em consideração as marcas mais consumidas e facilmente encontradas em Belo Horizonte. Foram adquiridas duas marcas diferentes de cada amostra, exceto para o patê de fígado, para o qual foi encontrada apenas uma marca comercial.

Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água deionizada pelo sistema Milli-Q®, modelo Direct-Q3, Millipore (Bedford, EUA). As soluções padrão foram preparadas por sucessivas diluições de soluções estoque monoelementares de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn de concentração  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , Titrisol®, Merck (Darmstadt, Alemanha).

Na etapa de decomposição de amostras foram utilizados  $\text{HNO}_3$  concentrado e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v v<sup>-1</sup>, Merck (Darmstadt, Alemanha).

Na avaliação da veracidade do método desenvolvido foram empregados os materiais de referência certificados de hepatopâncreas de lagosta (NRCC, National Research Council of Canada) e de fígado bovino (NIST, National Institute of Standards and Technology).

Todos os frascos utilizados passaram por prévia etapa de descontaminação a qual consistiu na lavagem com água corrente e detergente neutro, enxágüe com água deionizada e submersão em banho ácido ( $\text{HNO}_3$  10% v v<sup>-1</sup>) por um período mínimo de 24 h. Após esse período, os frascos foram lavados com água deionizada e deixados secando em capela cobertos com papel.

## 4.2. Equipamentos e acessórios

As etapas de preparo de amostras e de soluções envolveram a utilização dos seguintes equipamentos e acessórios:

- Liofilizador modelo Modulyod-230 (Thermo Scientific, EUA).
- Almofariz de ágata.
- Forno de micro-ondas com cavidade modelo ETHOS 1 (Milestone, Sorisole, Itália), equipado com sensores de temperatura e pressão e rotor composto por 10 vasos de perfluoroalcóxi (PFA), cuja pressão máxima é de 100 bar.
- Sistema de digestão *ultrawave* assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação, equipado com 5 frascos de quartzo (Milestone, Sorisole, Itália).
- Micropipetas de volumes variáveis Labmate+.
- Balança analítica modelo AX 200 com sensibilidade de 0,0001 g (Shimadzu do Brasil Comércio LTDA, São Paulo, Brasil).

As determinações de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo Spectra AA 240FS (Varian, Austrália), equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo. Todas as lâmpadas de cátodo oco monoelementares utilizadas são da marca Hitachi, EUA. Em todas as determinações, o equipamento operou com uma chama composta por ar/acetileno a uma taxa de 13,5/2 L min<sup>-1</sup>. A altura do queimador foi fixada em 13,5 mm e a taxa de aspiração do nebulizador foi mantida entre 5-5,5 mL min<sup>-1</sup>. Os parâmetros instrumentais adotados nas determinações de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais adotados na determinação de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn por FS FAAS operando em modo sequencial ou monoelementar.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Resolução espectral (nm)	Corrente da lâmpada de catodo oco (mA)
Cd	228,8	0,5	5,0
Cu	324,8	0,5	5,0
Fe	248,3	0,2	10,0
Mn	279,5	0,2	5,0
Pb	283,3	0,5	10,0
Zn	213,9	1,0	5,0

#### 4.3. Avaliação dos modos de operação do espectrômetro de absorção atômica com chama: modos monoelementar e sequencial

Nesta etapa foram comparados alguns parâmetros de mérito da técnica: sensibilidade (coeficiente angular da curva), precisão, limite de detecção e limite de quantificação, nos dois modos de operação do equipamento \_ monoelementar e sequencial.

Para a avaliação da sensibilidade foram preparadas três curvas analíticas em meio ácido, a partir de soluções intermediárias independentes, dentro da faixa linear recomendada pelo fabricante. Na sequência, as inclinações das retas geradas a partir da aplicação de regressão linear, no modo sequencial e no modo monoelementar foram comparadas. A Tabela 2 apresenta os níveis de concentração das soluções padrão preparadas para a construção das curvas analíticas preparadas para avaliação da sensibilidade nos dois modos de aquisição dos dados para a determinação de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn.

Tabela 2. Soluções padrão preparadas para avaliação da sensibilidade da técnica nos dois modos de operação do espectrômetro (n=3).

Soluções padrão	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
	(mg L <sup>-1</sup> )					
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,10	0,30	0,40	0,50	0,10	0,10
3	0,20	0,60	0,80	1,0	0,20	0,20
4	0,50	1,5	2,0	2,5	0,50	0,50
5	1,0	3,0	4,0	5,0	1,0	1,0

A precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foi avaliada considerando-se o desvio padrão relativo (DPR). Para tal, foram preparadas soluções padrão em HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup> em dois níveis de concentração para cada analito, 5 vezes independentemente. Para expressar a precisão intermediária, as soluções padrão foram preparadas de modo independente em dois dias diferentes. A Tabela 3 apresenta as soluções preparadas em dois níveis intermediários de concentração, dentro faixa utilizada na construção das curvas analíticas para cada analito da Tabela 1.

Tabela 3. Soluções padrão preparadas para avaliação da precisão nos dois modos de operação do espectrômetro (n=5).

Elemento	Solução padrão 1	Solução padrão 2
	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )
Cd	0,15	0,75
Cu	0,45	2,25
Fe	0,60	3,0
Mn	0,30	1,5
Pb	0,15	0,75
Zn	0,15	0,75

Para determinação dos limites de detecção e quantificação foram utilizadas as medidas de 10 brancos, preparados de forma independente de acordo com o guia de validação da IUPAC. (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

#### **4.4. Liofilização, moagem e estocagem das amostras de patês**

As amostras de patês (atum, fígado, frango, peito de peru e presunto) foram adquiridas em supermercados de Belo Horizonte. Depois de aberta a embalagem, todo o conteúdo foi liofilizado por um período de 12h. Em seguida, as amostras foram submetidas à moagem em almofariz de ágata e estocadas em geladeira. O tempo decorrido entre a compra, liofilização e moagem das amostras não excedeu 4 dias.

#### **4.5. Avaliação da eficiência de soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> empregadas na etapa de decomposição das amostras de patês**

Nesta etapa foi utilizado um forno de micro-ondas com cavidade para a decomposição das amostras, empregando um programa de aquecimento que consistiu de i) uma rampa de aquecimento de 10 minutos até que fosse alcançada a temperatura de 180 °C; ii) um patamar de 15 minutos em que os frascos permaneceram sob essa temperatura com potência máxima fixada em 1000 W; iii) uma etapa de resfriamento do sistema por um período de 30 minutos. Em seguida, os frascos foram retirados do forno e deixados na capela com exaustão até o completo resfriamento. O programa de aquecimento mencionado foi empregado em todas as decomposições realizadas, nas quais a uma massa de aproximadamente 250 mg de cada tipo de amostra de patê foram adicionados 7 mL de HNO<sub>3</sub> e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v v<sup>-1</sup>. Os volumes de reagentes oxidantes totalizando 8 mL não foram escolhidos aleatoriamente, pois trata-se do volume mínimo necessário para que o sensor meça a temperatura no frasco de referência. O volume final de digerido foi de 15 mL.

A eficiência de digestão das amostras foi avaliada empregando-se três concentrações diferentes de HNO<sub>3</sub>: 14 mol L<sup>-1</sup> (concentrado) e soluções diluídas, nas concentrações de 7 e 3,5 mol L<sup>-1</sup>. Também foi avaliada a

necessidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante auxiliar. Nos três procedimentos de digestão avaliados foi adicionado primeiramente o  $\text{HNO}_3$ , deixado em contato com a amostra por aproximadamente 30 minutos e posteriormente adicionou-se o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Também foi avaliada a utilização de solução de  $\text{HNO}_3$  2 mol  $\text{L}^{-1}$  juntamente com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na decomposição das amostras. Entretanto, para patês com maior teor de gordura tais como presunto e fígado não foi alcançada eficiente digestão, sendo detectados grânulos gordurosos dispersos nos digeridos obtidos.

Foram realizadas determinações de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn nos digeridos obtidos a partir dos três procedimentos de digestão de amostras. As curvas de calibração foram preparadas em  $\text{HNO}_3$  de concentração próxima à acidez final dos digeridos. A Figura 1 apresenta o programa de aquecimento utilizado na etapa de digestão de amostras no forno de micro-ondas com cavidade. Foi possível determinar Cu apenas nos digeridos do patê de fígado, para os demais patês a concentração de Cu foi inferior ao limite de quantificação da técnica.

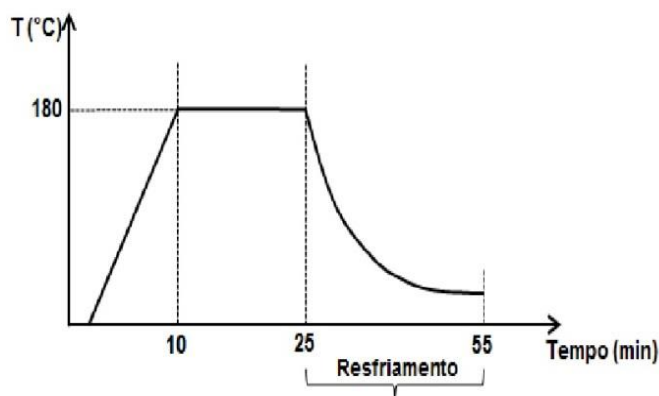


Figura 1. Programa de aquecimento empregado na etapa de digestão em forno micro-ondas com cavidade.

Com o objetivo de determinar as concentrações de Cu em todas as amostras de patês e também as concentrações de Cd, Pb e Mn, empregou-se um procedimento de digestão em *ultrawave*, no qual uma massa de 2 g de amostra foi digerida com um volume de 12 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$  e volume final igual a 20 mL. O programa de aquecimento consistiu de uma rampa de aquecimento de 20 minutos até alcançar a temperatura de 250 °C, um patamar



de 10 minutos em 250 °C seguido de etapa de resfriamento de 30 minutos, com potência máxima fixada em 1500 W. O programa de aquecimento foi sugerido pelo fabricante do equipamento quando da digestão de amostras de alimentos. A Figura 2 apresenta o programa de aquecimentos utilizado na etapa de digestão de amostras no *ultrawave*.

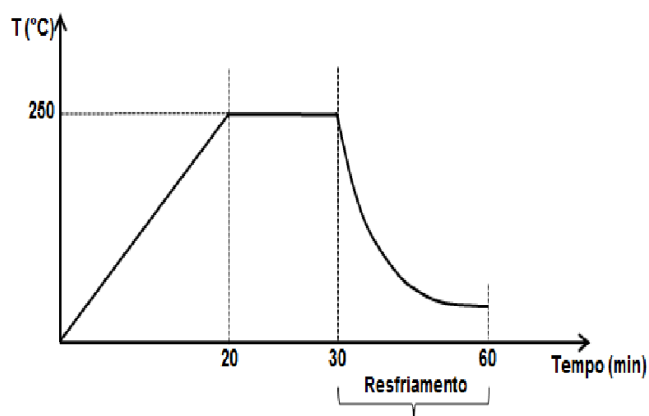


Figura 2. Programa de aquecimento empregado na etapa de digestão em sistema *ultrawave* de cavidade única.

Como o sistema *ultrawave* não pertencia ao laboratório e permaneceu por um período de tempo pequeno no laboratório, não foi possível validar o método. Os resultados foram obtidos para um tipo de patê empregando  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$ , e serão mostrados e discutidos posteriormente.

Já para o forno de micro-ondas com cavidade, foram efetuadas determinações de Cu, Fe, Mn e Zn e os resultados dos três procedimentos de digestão foram comparados. O procedimento de decomposição de 250 mg de amostra utilizando 7 mL de  $\text{HNO}_3$  3,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v v<sup>-1</sup> foi estendido para outras amostras de patês e escolhido para a etapa de validação.

#### 4.6. Procedimento de validação do método envolvendo a digestão dos patês com $\text{HNO}_3$ 3,5 mol $\text{L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ 30% v v $^{-1}$ e posterior determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FS FAAS

A avaliação das figuras de mérito foi realizada para o patê de presunto e, posteriormente, o método desenvolvido e validado foi aplicado a outras amostras de patês.

Para avaliar a linearidade e a seletividade (efeito de matriz) foram preparadas de forma independente três curvas de calibração por padrões externos (em branco analítico) e três curvas de adição de padrão (em que os analitos foram adicionados aos digeridos). As curvas de calibração foram preparadas em cinco níveis de concentração, mostrados na Tabela 4, igualmente espaçados (Thompson *et al.*, 2002) e a partir de soluções intermediárias multielementares independentes. Os resultados das determinações de Mn em todas as amostras foram inferiores ao limite de quantificação fornecido para a técnica. Desse modo, para esse elemento as amostras foram assumidas como amostras brancas.

Foram preparados brancos analíticos em triplicata para cada curva de calibração que foram utilizados para ajuste do equipamento, mas não incluídos nos cálculos. Todas as soluções foram medidas em ordem aleatória.

Tabela 4. Soluções padrão multielementares utilizadas na avaliação da linearidade e seletividade.

Elemento	Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4	Solução 5
	mg $\text{L}^{-1}$				
Cu	0,60	1,20	1,80	2,40	3,0
Fe	0,60	1,20	1,80	2,40	3,0
Mn	0,20	0,40	0,60	0,80	1,0
Zn	0,20	0,40	0,60	0,80	1,0

A Figura 3 apresenta um esquema de preparo das curvas de calibração por padrões externos, evidenciando que as replicatas devem ser independentes e não meramente replicatas de leitura para cada nível de

concentração. É válido ressaltar que o procedimento descrito nessa figura foi realizado em triplicata para a curva de calibração preparada em meio ao branco analítico (por padrões externos) e também para a curva de calibração preparada em meio dos digeridos de cada tipo de patê (adição de padrão). Os parâmetros foram estimados através do método de mínimos quadrados ordinários (MMQO) e algumas premissas relacionadas aos resíduos foram checadas. A normalidade e a independência dos dados foram checadas através dos testes de Ryan-Joiner e de Durbin-Watson, respectivamente.

A detecção e exclusão de *outliers* foi realizada empregando-se o teste de resíduos padronizados de Jackknife, com  $n-p-1$  graus de liberdade, sendo  $n$  o número de resíduos e  $p$  o número de parâmetros do modelo. A homoscedasticidade dos dados foi avaliada através da modificação do teste de Levene proposta por Brown e Forsythe.

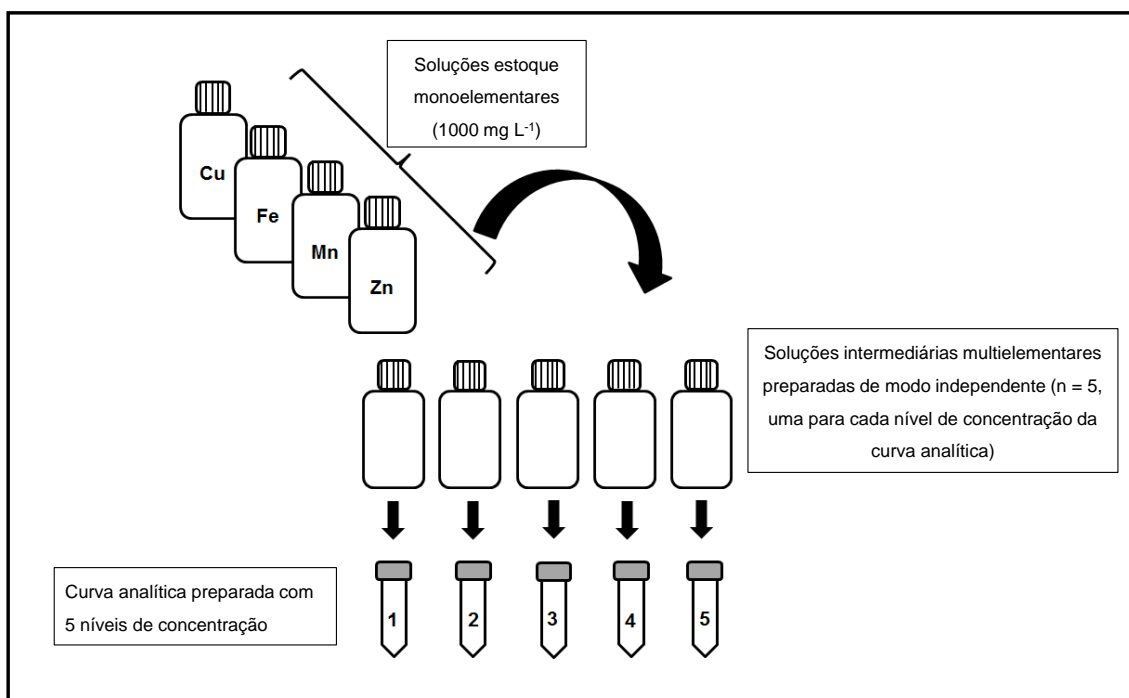


Figura 3. Esquema de preparo de cada uma das curvas analíticas utilizadas na avaliação da linearidade e da seletividade.

Para avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foram preparadas soluções multielementares em branco analítico, em três níveis de concentração para Cu, Fe, Mn e Zn. Foram preparadas 7 replicatas

independentes para cada nível de concentração. O desvio padrão relativo obtido entre as concentrações dessas replicatas foi usado para expressar a repetibilidade. Para expressar a precisão intermediária, as mesmas soluções foram preparadas em outro dia, e o DPR entre as medidas dos dois dias foi usado para avaliar a precisão intermediária. A Tabela 5 apresenta as soluções multielementares preparadas para avaliação da precisão.

Tabela 5. Soluções padrão multielementares preparadas em meio ao branco analítico para avaliação da precisão (n=7).

Elemento	Solução 1 (mg L <sup>-1</sup> )	Solução 2 (mg L <sup>-1</sup> )	Solução 3 (mg L <sup>-1</sup> )
Cu	0,30	0,60	1,5
Fe	0,30	0,60	1,5
Mn	0,30	0,60	1,5
Zn	0,15	0,30	0,75

Os limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com o guia de validação elaborado pela IUPAC em 2002.

A veracidade do método desenvolvido foi confirmada com a utilização de dois materiais de referência certificados: fígado bovino (NIST 1577c) e hepatopâncreas de lagosta (NRCC, Tort-2) e também por ensaios de adição/recuperação em três níveis de concentração dentro da faixa linear adotada após a avaliação da linearidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação dos modos de operação do espectrômetro de absorção atômica com chama: modos monoelementar e sequencial

Como descrito no item 4.3, alguns parâmetros de mérito obtidos através de determinações com o espectrômetro operando em modo monoelementar e em modo sequencial foram comparados. O primeiro parâmetro avaliado foi a sensibilidade de cada analito nos dois modos de operação do espectrômetro.

Um método é dito sensível quando pequenas mudanças na concentração ou quantidade do analito causam uma considerável mudança no sinal medido (Taverniers *et al.*, 2004). A sensibilidade pode ser expressa como a inclinação da curva de calibração depois de empregado o método de mínimos quadrados ordinários (INMETRO, 2003).

A Tabela 6 apresenta as equações das retas geradas para as curvas de calibração de Cd, Fe, Cu, Mn, Pb e Zn, preparadas de modo independente. As determinações foram realizadas no mesmo dia, no modo de operação monoelementar e no modo sequencial de operação do espectrômetro.

Tabela 6. Equações de reta\* das curvas analíticas multielementares determinadas nos dois modos de operação do espectrômetro de chama.

Elemento	Equações de reta das curvas de calibração	
	(n=3)	
	Monoelementar	Sequencial
Cd	$y = 0,1900x + 0,0067$	$y = 0,1928x + 0,0060$
	$y = 0,1903x + 0,0064$	$y = 0,1930x + 0,0059$
	$y = 0,1907x + 0,0067$	$y = 0,1933x + 0,0063$
Cu	$y = 0,1134x + 0,0040$	$y = 0,1118x + 0,0049$
	$y = 0,1139x + 0,0039$	$y = 0,1119x + 0,0046$
	$y = 0,1132x + 0,0040$	$y = 0,1120x + 0,0052$
Mn	$y = 0,1674x + 0,0391$	$y = 0,1656x + 0,0395$
	$y = 0,1667x + 0,0371$	$y = 0,1656x + 0,0402$
	$y = 0,1668x + 0,0375$	$y = 0,1659x + 0,0393$
Pb	$y = 0,0189x + 0,0013$	$y = 0,0185x + 0,0010$
	$y = 0,0190x + 0,0014$	$y = 0,0186x + 0,0014$
	$y = 0,0193x + 0,0008$	$y = 0,0190x + 0,0007$
Zn	$y = 0,2483x + 0,0089$	$y = 0,2454x + 0,0089$
	$y = 0,2485x + 0,0090$	$y = 0,2456x + 0,0089$
	$y = 0,2488x + 0,0091$	$y = 0,2459x + 0,0093$

$y = ax + b$ , em que  $y$  = absorvância,  $x$  = concentração elementar,  $a$  = coeficiente angular e  $b$  = intercepto

Como pode ser visto na Tabela 6, os valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas para cada analito, nos dois modos de operação do espectrômetro são muito próximos, diferindo na maioria dos casos, a partir da terceira casa decimal.

A Figura 4 apresenta os gráficos das curvas de calibração geral, nas quais o número total de pontos é 15 porque foram utilizados os dados das 3 curvas de calibração preparadas independentemente. O modelo de regressão linear foi empregado e os coeficientes angulares, usados para avaliar a

sensibilidade obtida nos dois modos de operação do equipamento, possuem valores muito próximos.

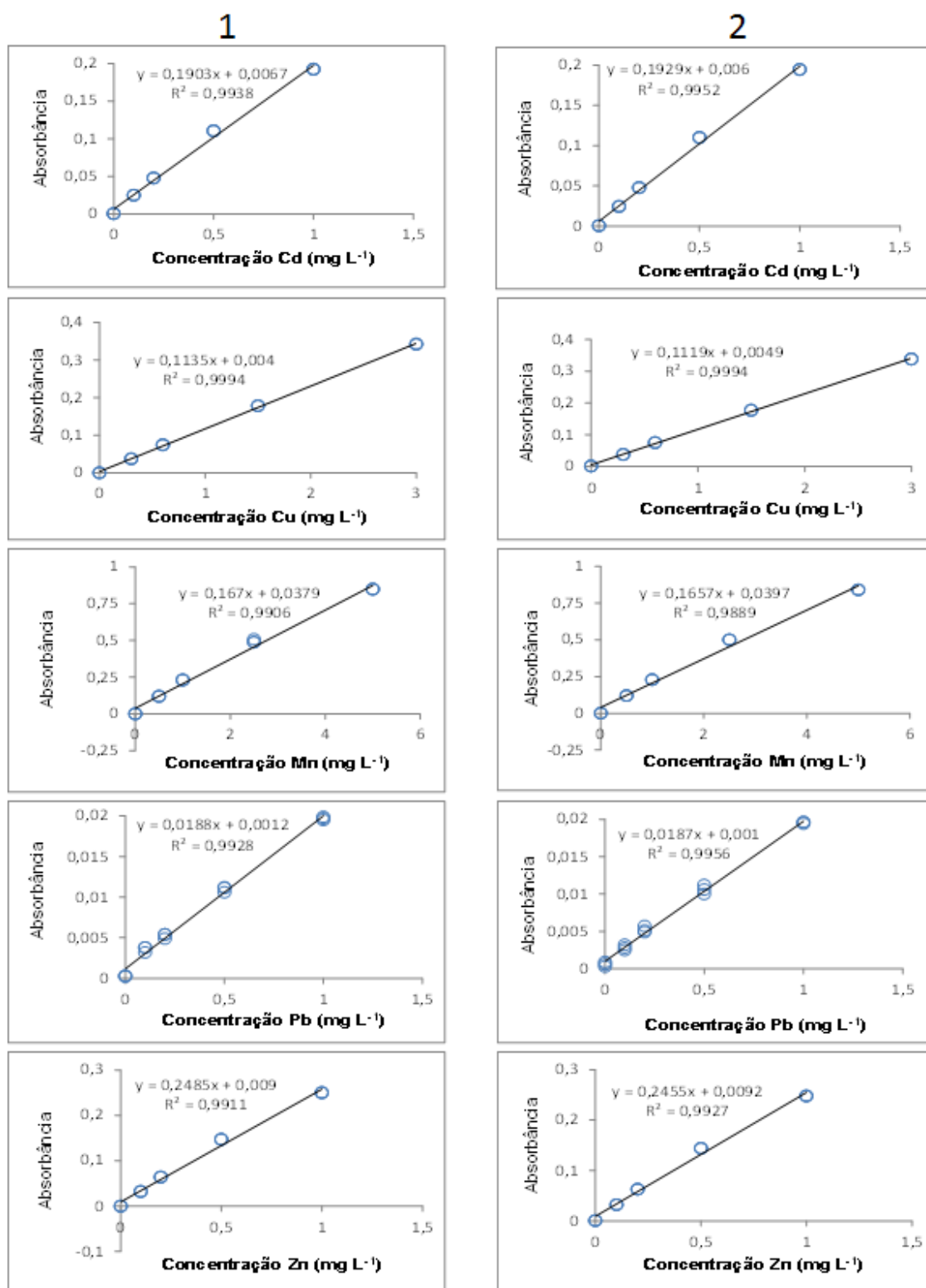


Figura 4. Curvas analíticas construídas com 15 pontos e determinadas nos modos de operação do espectrômetro: 1) monoelementar e 2) seqüencial.

É importante salientar que não foi realizada a avaliação criteriosa da faixa linear de trabalho ou do modelo estatístico que promovesse o melhor ajuste dos dados com menor soma quadrática dos resíduos. Essa avaliação apenas pretendeu verificar as sensibilidades alcançadas nos dois modos de operação do equipamento, comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas.

É possível verificar que as curvas de calibração de Cu foram as que forneceram maiores valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e, por conseguinte os maiores valores de coeficiente de correlação ( $r$ ), já que:

$$r = \sqrt{R^2} \text{ (equação 2)}$$

Valores de coeficiente de correlação muito próximos de 1 podem levar precipitadamente à suposição de que a faixa de concentração avaliada é linear. Entretanto, apenas o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) ou do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração (Araujo, 2002).

Discussões sobre as premissas a serem checadas para estabelecimento da linearidade serão encontradas no item 5.3 que apresenta a etapa de validação realizada.

A repetibilidade de dois níveis de concentração para cada analito nos dois modos de operação do espectrômetro é mostrada na Tabela 7. Para tal avaliação foi determinado o desvio padrão relativo (como na equação 3), entre as replicatas (independentes) de cada nível de concentração para determinações realizadas no mesmo dia.

$$DPR = \left( \frac{s}{\bar{y}} \right) \times 100 \text{ (equação 3)}$$

onde,  $s$  = desvio padrão de 5 medidas de cada solução padrão e  $\bar{y}$  = média das 5 medidas de cada solução padrão.



Tabela 7. Repetibilidade expressa como DPR de 5 determinações de soluções multielementares em cada modo de operação do equipamento.

Analito	Repetibilidade (DPR)			
	Solução padrão 1		Solução padrão 2	
	Monoelementar	Sequencial	Monoelementar	Sequencial
Cd	0,33	0,82	0,40	0,44
Cu	0,79	0,70	0,42	0,42
Fe	0,90	1,09	0,87	0,79
Mn	0,38	0,32	0,35	0,43
Pb	3,43	4,76	1,67	1,74
Zn	0,28	0,24	0,23	0,44

Todos os valores de repetibilidade foram inferiores a 2% nos modos monoelementar e sequencial de trabalho. Somente para a primeira solução de Pb de concentração igual a 0,15 mg L<sup>-1</sup> os valores foram superiores a 3%. Nesse nível de concentração não foi possível garantir adequada precisão das medidas, pois o sinal de absorvância obtido confundiu-se com o sinal de fundo. O DPR que caracterizou a precisão intermediária foi inferior a 10% para ambos os modos de operação.

Os parâmetros limites de detecção e quantificação (equações 4 e 5) foram avaliados para os dois modos de leitura e são mostrados na Tabela 8.

$$LD = (3 \times S) \div \alpha \quad (\text{equação 4})$$

$$LQ = (10 \times S) \div \alpha \quad (\text{equação 5})$$

onde,  $S$  = desvio padrão de medidas de 10 brancos da curva preparados de forma independente e  $\alpha$  = inclinação da reta de regressão gerada pelo método de mínimos quadrados.

É possível quantificar abaixo do limite de quantificação, entretanto tais valores serão duvidosos, com a incerteza associada maior do que o valor de medição (Taverniers *et al.*, 2004).

Tabela 8. Limites de detecção e quantificação calculados para Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn nos dois modos de operação do espectrômetro.

Elemento	Monoelementar		Sequencial	
	LD* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ** ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Cu	7,23	24,1	6,27	20,9
Cd	4,02	13,4	3,77	12,6
Fe	33,3	111	38,7	122
Mn	8,63	28,1	8,77	27,3
Pb	35,8	119	52,1	174
Zn	2,73	9,08	2,70	9,00

\* Limite de detecção; \*\* Limite de quantificação

Quando possível, a determinação sequencial dos analitos é aconselhável, pois as vantagens da FAAS (arranjo monoelementar) tais como robustez, facilidade de operação e custo relativamente baixos de aquisição e manutenção do equipamento são mantidas. Soma-se a essas vantagens o menor tempo total de análise, uma vez que o equipamento opera de modo sequencial, em ordem decrescente de comprimentos de onda dos analitos (Miranda e Pereira-Filho, 2009). Como já ressaltado anteriormente, além do fato dessa determinação sequencial ser realizada em um curto intervalo de tempo, é possível utilizar um padrão interno para corrigir principalmente efeitos relacionados à etapa de preparo de amostras (Miranda *et al.*, 2010).

A determinação sequencial de 4 elementos foi realizada em menos de 30 segundos com consumo de amostra inferior a 1 mililitro.

## **5.2. Avaliação da eficiência de soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> empregadas na etapa de decomposição das amostras de patês**

Ainda é usual digerir amostras com volumes consideráveis de ácidos concentrados e aumento de temperatura para acelerar a oxidação dos compostos. Em digestões assistidas por radiação micro-ondas que se processam em sistemas fechados, o HNO<sub>3</sub> concentrado é o ácido mais empregado, em função do aumento de seu potencial de oxidação da matéria orgânica sob alta pressão e por formar nitratos solúveis com a grande maioria dos elementos (Krug, 2010; Smith e Arsenault, 1996).

Entretanto, na busca por métodos que levem a menores quantidades de resíduos e que sejam mais seguros e se adequem à química verde, vem aumentando o desenvolvimento de metodologias alternativas com o uso de ácidos diluídos na etapa de digestão das amostras. Nesse contexto, as amostras foram digeridas empregando-se 3 concentrações de HNO<sub>3</sub> (14, 7 e 3,5 mol L<sup>-1</sup>) utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante auxiliar. Em todos os digeridos as concentrações de Mn encontraram-se abaixo do limite de quantificação da técnica.

As concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas por FS FAAS nos digeridos de cada procedimento de digestão são mostradas na Tabela 9. Vale ressaltar que os resultados são apresentados em função do peso em massa seca, pois todas as amostras foram devidamente liofilizadas antes dos procedimentos de digestão.

Tabela 9. Concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas por FS FAAS nos digeridos para os três procedimentos de digestão em forno de micro-ondas com cavidade (n=3).

Patê	Analitos	Digestão de 250 mg de amostra com 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % vv <sup>-1</sup> + 7 mL de		
		1) HNO <sub>3</sub>	2) HNO <sub>3</sub>	3) HNO <sub>3</sub>
		14 mol L <sup>-1</sup>	7,0 mol L <sup>-1</sup>	3,5 mol L <sup>-1</sup>
(mg kg <sup>-1</sup> )				
Atum	Cu	< LQ	< LQ	< LQ
	Fe	31,2 ± 0,9	32,5 ± 0,8	30,5 ± 0,9
	Zn	8,9 ± 0,9	9,7 ± 0,2	9,5 ± 0,2
Frango	Cu	< LQ	< LQ	< LQ
	Fe	16,2 ± 1,1	17,2 ± 0,7	17,2 ± 0,6
	Zn	9,7 ± 1,2	11,6 ± 0,6	11,4 ± 0,4
Fígado	Cu	48,5 ± 1,1	48,9 ± 0,5	48,5 ± 0,8
	Fe	144,1 ± 0,9	147,1 ± 1,2	145,6 ± 0,7
	Zn	68,6 ± 0,4	75,6 ± 0,4	68,1 ± 0,6
Peito de peru	Cu	< LQ	< LQ	< LQ
	Fe	12,9 ± 0,9	10,4 ± 0,5	13,2 ± 0,3
	Zn	26,4 ± 0,5	26,5 ± 0,6	27,2 ± 0,4
Presunto	Cu	< LQ	< LQ	< LQ
	Fe	21,8 ± 0,8	20,1 ± 0,8	21,7 ± 0,4
	Zn	39,1 ± 0,7	41,8 ± 0,4	40,2 ± 0,4

As concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas nos digeridos de patês foram similares independente da concentração do ácido. Como descrito no item 3.4, não há legislação específica que discrimine os valores máximos tolerados para micronutrientes ou elementos tóxicos em amostras de patês. Entretanto, a partir de 2011 foi disponibilizado o regulamento técnico MERCOSUL que preconiza limite máximos de elementos tóxicos tais como As, Cd, Hg e Pb para diferentes tipos de carnes (bovinos suínos, caprinos, ovinos e peixes)

(MERCOSUL, 2011). Desse modo, serão considerados os limites de micronutrientes preconizados pela ANVISA para alimentos (ANVISA, 1965).

Considerando-se os digeridos obtidos no terceiro procedimento (com  $\text{HNO}_3$  3,5 mol  $\text{L}^{-1}$ ), as concentrações de Fe variaram de 17,2 mg  $\text{kg}^{-1}$  no patê de frango a 145,6 mg  $\text{kg}^{-1}$  no patê de fígado. Não há na legislação um valor de limite máximo tolerado para Fe em alimentos.

Como pode ser observado na Tabela 9, os resultados das concentrações foram similares para todas as concentrações ácidas empregadas, porém foi realizada uma comparação estatística entre as concentrações dos analitos no procedimento de digestão com  $\text{HNO}_3$  concentrado e com  $\text{HNO}_3$  3,5 mol  $\text{L}^{-1}$  através do emprego de testes  $F$  e  $t$ .

Para comparação estatística das médias de concentrações obtidas pelos dois procedimentos, efetuou-se primeiramente um teste  $F$ , como apresentado na equação 6. Sendo o valor calculado de  $F$  menor que o tabelado, partiu-se para o cálculo do desvio padrão agrupado (equação 7), e posteriormente para o teste  $t$  (equação 8), em nível de 95% de confiança e 2 graus de liberdade (Barros Neto, 2007).

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{equação 6})$$

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}} \quad (\text{equação 7})$$

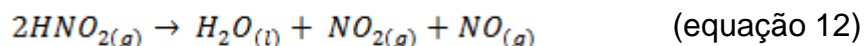
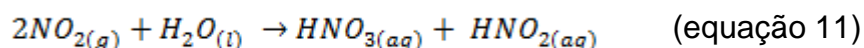
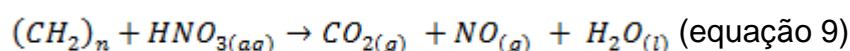
$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_p \times \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad (\text{equação 8})$$

Não houve diferenças significativas, a 95% de confiança, entre as concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas nos digeridos quando se empregou  $\text{HNO}_3$  concentrado ou  $\text{HNO}_3$  3,5 mol  $\text{L}^{-1}$ . A eficiência das soluções diluídas de  $\text{HNO}_3$  na etapa de digestão dos patês se deveu ao processo de regeneração do ácido nítrico, que sofre decomposição térmica produzindo diferentes óxidos solúveis em água com características oxidantes (Araújo *et al.*, 2002).

A digestão das amostras utilizando-se  $\text{HNO}_3$  diluído é aconselhável, uma vez que haverá menor consumo de reagentes concentrados, geração de

resíduos menos ácidos, menores valores de desvio padrão e menor valor de branco analítico.

Quando se utiliza HNO<sub>3</sub> diluído para oxidar compostos orgânicos, há produção de NO<sub>(g)</sub> que reage com o O<sub>2</sub> presente na fase gasosa do frasco de reação e gera NO<sub>2(g)</sub>, que é reabsorvido na fase líquida ocorrendo a formação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e HNO<sub>2</sub> e promovendo a regeneração do HNO<sub>3</sub> adicionado. Esse ciclo, representado pelas reações descritas nas equações 9-12, se repete até que não haja mais O<sub>2</sub> presente na fase gasosa do frasco reacional (Castro *et al.*, 2009). É importante salientar que durante a digestão, nos fornos de micro-ondas atuais há um gradiente de temperatura dentro dos frascos que favorece a condensação dos produtos gasosos formados nas reações de oxidação (Gonzalez *et al.*, 2009).

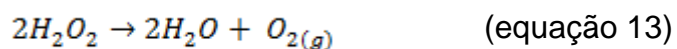


As reações envolvidas no ciclo de regeneração do HNO<sub>3</sub> evidenciado nas equações 9-12 são criticamente dependentes do volume de O<sub>2</sub> presente na fase gasosa dentro do vaso reacional do forno de micro-ondas (Bizzi *et al.*, 2010).

Foi realizado um procedimento de decomposição das amostras com 8 mL de HNO<sub>3</sub> 3,5 mol L<sup>-1</sup>, sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como reagente oxidante auxiliar. Entretanto, para amostras com maior teor de gordura, como os patês de fígado e presunto, foi verificada a presença de grânulos gordurosos dispersos nos digeridos.

Procedimentos de digestão assistida por radiação micro-ondas realizados em fornos com cavidade que não dispõem de sistema de pressurização, geralmente requerem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como reagente oxidante auxiliar. A reação de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (equação 13) contribuirá com O<sub>2</sub> na fase gasosa, que será usado nas reações de regeneração do HNO<sub>3</sub>. Esse fato foi

evidenciado por alguns autores que empregaram HNO<sub>3</sub> diluído e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na etapa de digestão de plantas, amostras de bovinos (sangue, músculo e vísceras) e grãos de soja e café (Araujo *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2009 e Castro *et al.*, 2009).



Quando se dispõe de um forno de micro-ondas com cavidade com sistema de pressurização, é possível aumentar o volume de O<sub>2</sub> na fase gasosa do frasco reacional e, por conseguinte obter digestões eficientes utilizando soluções de HNO<sub>3</sub> bastante diluídas, e dispensando o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isso foi relatado por Bizzi e colaboradores, ao demonstrarem que a oxidação da matéria orgânica foi mais efetiva quando os vasos reacionais foram pressurizados com 2 MPa de O<sub>2</sub>. Dessa forma, os autores obtiveram eficiente digestão de 100 mg de fígado bovino usando HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Bizzi *et al.*, 20010).

Com o intuito de determinar Mn nas amostras e Cu nas demais amostras, pois somente foi possível sua determinação no patê de fígado, empregou-se um procedimento de digestão assistida por radiação micro-ondas no *ultrawave*, que permite digerir maiores massas de amostra, diminuindo o fator de diluição final dos digeridos.

Neste equipamento (mostrado na Figura 4) os vasos reacionais são inseridos em uma cavidade única, maiores temperaturas (até 300 °C) e pressões (até 199 bar) são alcançadas, garantindo a completa digestão de maiores massas de amostras em relação à digestão nos fornos de micro-ondas com cavidade. Além disso, ele dispõe de um controlador automático que irradia potência suficiente para seguir o programa de temperatura desejado e o controle de temperatura e pressão é feito em todos os frascos.

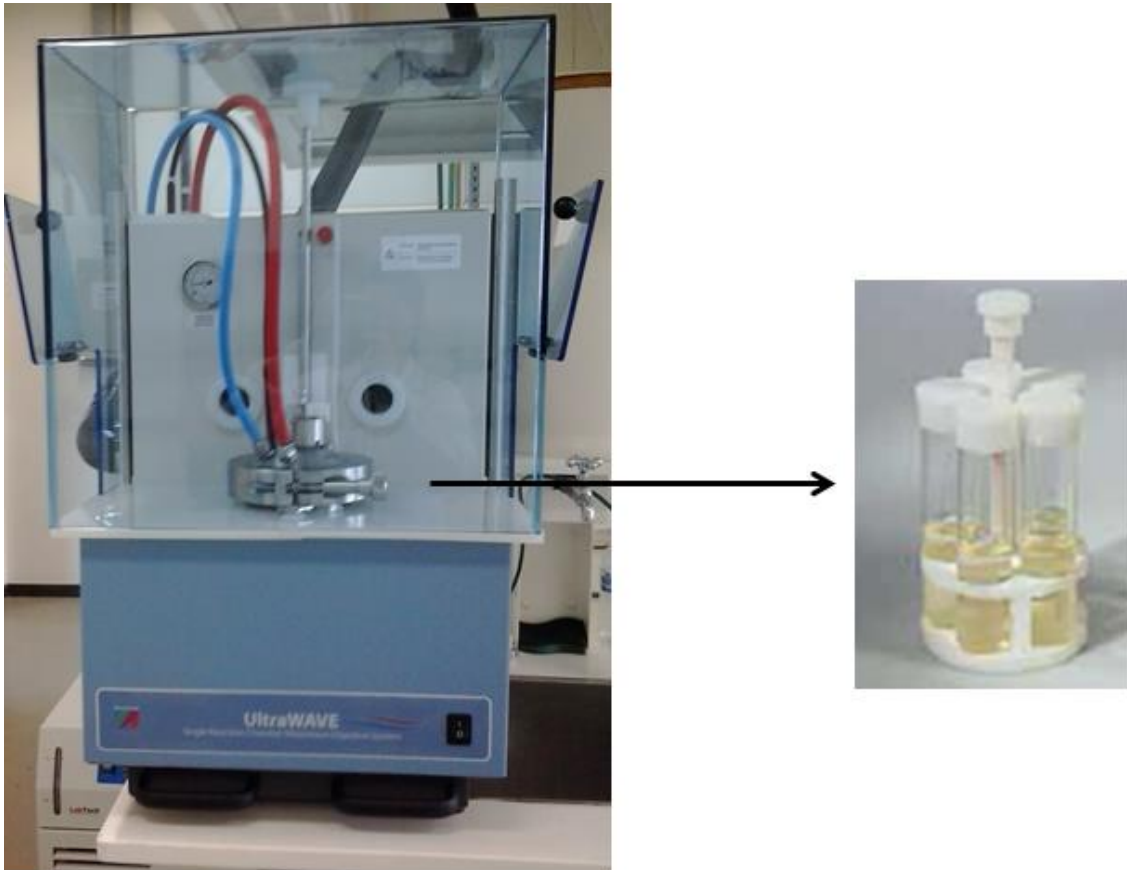


Figura 5. Sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade única - *ultrawave* - e suporte com 5 frascos de quartzo com capacidade de 40 mL cada.

Nóbrega e colaboradores avaliaram a eficiência de digestão de amostras de referência certificadas (folhas de maçã, fígado bovino e leite em pó) empregando-se soluções diluídas de  $\text{HNO}_3$  e suporte com 15 frascos de TFM<sup>®</sup> com capacidade de 15 mL cada, no sistema *ultrawave*. Os autores obtiveram adequada eficiência de digestão empregando 5 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol L<sup>-1</sup> para digerir 0,5 g de amostras. Os conteúdos de carbono residual determinados nos digeridos foram iguais a 0,05 e 0,2 % para leite em pó e fígado bovino, respectivamente (Nóbrega *et al.*, 2012).

Neste trabalho de tese, empregou-se de 12 mL  $\text{HNO}_3$  7 mol L<sup>-1</sup> para digerir 2 g de amostras, com volume final aferido com água deionizada para 20 mL. Neste caso, foi utilizado o suporte com 5 frascos de quartzo, com capacidade de 40 mL cada. A Figura 6 apresenta o aspecto final dos digeridos de patês de fígado e presunto assim que retirados da cavidade do *ultrawave*.



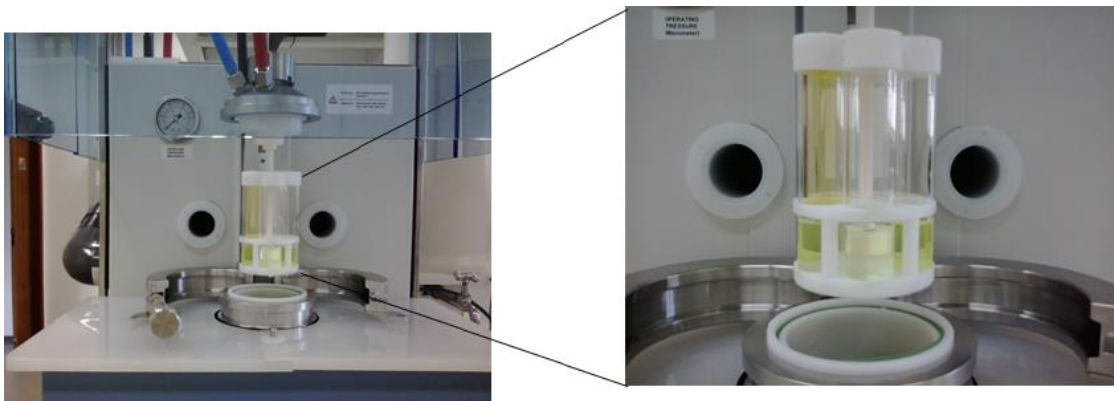


Figura 6. Digeridos de patês de fígado e presunto obtidos após etapa de digestão no *ultrawave*.

A Tabela 10 apresenta as concentrações de Cu e Mn determinadas nos digeridos das amostras de patês. Não foram determinadas as concentrações de Fe e Zn nesses digeridos.

Tabela 10. Concentrações de Cu e Mn determinadas nas amostras de patês digeridas em *ultrawave* (n=3).

Patê	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )
Atum	1,3 ± 0,4	0,99 ± 0,04
Frango	< LQ	< LQ
Fígado	48,3 ± 1,2	3,6 ± 0,2
Peito de peru	< LQ	< LQ
Presunto	1,7 ± 0,1	< LQ

Não foi possível determinar Cu e Mn nas amostras de patês de frango e peito de peru, além da amostra de patê de presunto para Mn. As concentrações de Cu nos patês de atum e de presunto foram similares, e a maior concentração de Mn determinada do patê de fígado, muito próxima do limite de quantificação do método, exposto adiante. Foi possível obter um fator de diluição igual a 10 vezes, inferior ao fator de diluição obtido no procedimento em forno de micro-ondas, que foi de 60 vezes. Como já exposto, o sistema de digestão *ultrawave* possui uma série de vantagens e permite a digestão de

maiores massas de amostras, além de seus frascos serem de mais fácil manuseio e uso, dispensando o uso de camisas que os envolvam como nos fornos de micro-ondas com cavidade. Entretanto, tal equipamento ainda não se encontra disseminado em laboratórios de pesquisa, menos ainda em laboratórios de rotina, devido ao alto custo de aquisição se comparado aos fornos de micro-ondas com cavidade.

Diante das vantagens do uso de soluções diluídas de  $\text{HNO}_3$ , o procedimento de digestão de amostras no qual foi utilizado  $\text{HNO}_3$  3,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante auxiliar na digestão de patês em forno de micro-ondas com cavidade, foi aplicado a outras amostras de patês, após a etapa de validação do método analítico.

### **5.3. Procedimento de validação do método envolvendo a digestão dos patês com $\text{HNO}_3$ 3,5 mol $\text{L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ 30% v v<sup>-1</sup> e posterior determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FS FAAS**

A etapa de validação do presente método baseou-se principalmente nas recomendações do INMETRO (2011), MAPA (2012), IUPAC (2002) e em trabalhos publicados por Souza e Junqueira.

Foram realizados os ensaios relacionados à avaliação de linearidade e efeito de matriz para cada uma das 5 amostras de patês. Entretanto, elegeu-se a amostra de patê de presunto para demonstrar toda a sequência envolvida na validação aqui proposta, por ser essa a amostra mais complexa e com maior teor de gordura.

#### **5.3.1. Linearidade e seletividade**

A maioria dos métodos de análise elementar em alimentos utiliza relações lineares. Assim, a determinação da equação de calibração é muito importante tanto em análises de rotina quanto em procedimentos de validação de métodos (RSC, 2005).

A avaliação da linearidade geralmente envolve o preparo de curvas analíticas de calibração com ou sem matriz, com 5 a 6 níveis de concentração, incluindo-se ou não o zero e com um mínimo número de replicatas por nível,

que represente a rotina do laboratório e a medida das respostas das soluções de calibração em ordem aleatória. O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é o mais usado para a avaliação da linearidade e grande parte das referências recomenda a estimativa dos parâmetros e dos resíduos (erros) da regressão, além da inspeção visual do gráfico da curva de calibração (x-y) e do gráfico de resíduos. (INMETRO, 2003; MAPA, 2012; Murphy *et al.*, 2013; IUPAC, 2002; Taverniers *et al.*, 2004; INMETRO, 2011).

Para as amostras de patês de presunto e fígado as concentrações de Mn determinadas foram próximas ao limite de detecção da técnica. Dessa maneira, considerando a variabilidade de marcas, embalagens e tipos de carnes empregadas na preparação dos patês, decidiu-se por prosseguir com a validação também para esse analito.

Assim, para avaliar a linearidade e efeito de matriz, como descrito no item 4.6, três curvas multielementares independentes contendo Cu, Fe, Mn e Zn foram preparadas em meio ao branco analítico (padrões externos) e em meio dos digeridos das amostras. No caso das curvas construídas em meio dos digeridos, aplicou-se o procedimento de adição de padrão e o volume de digerido adicionado levou em consideração a concentração dos analitos presentes na amostra.

É importante salientar que os níveis de concentração preparados devem ser igualmente espaçados, de modo a evitar os chamados pontos de alavanca, que representam *outliers* do eixo x. Construindo a curva desse modo, se houver a detecção de um *outlier*, provavelmente será um valor discrepante real e não devido apenas ao delineamento experimental. Se houver erros consideráveis em x, deve-se recorrer ao método de mínimos quadrados ortogonais (Souza, 2007).

As curvas preparadas devem ser obtidas em condições de repetibilidade e não de precisão intermediária (reprodutibilidade parcial) para que a variância dos resíduos não seja superestimada. Também não devem ser realizadas replicatas de leitura, pois desse modo, a variância dos resíduos seria subestimada e o modelo seria acusado como não linear. A determinação das curvas de calibração utilizadas para avaliação da linearidade e efeito de matriz deve ser feita de modo aleatório. Isso é feito para evitar a influência de efeitos

temporais, o que é mais crítico quando se utiliza equipamentos que ganham desempenho ao longo do tempo (Souza, 2007).

As premissas referentes à normalidade, independência e homoscedasticidade dos dados, além da detecção dos *outliers* e significância do modelo de regressão linear foram avaliadas tanto para a curva preparada por padrões externos, quanto para a curva preparada em meio dos digeridos da amostra de patê de presunto. Após a etapa de validação o método analítico foi aplicado a outras amostras de patês.

Para a identificação e exclusão de valores discrepantes foi utilizado o método de resíduos padronizados de Jacknife ( $J_{ei}$ ), que são calculados para cada ponto da curva de calibração. Foram considerados valores discrepantes aqueles que se encontraram fora do intervalo determinado como  $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} \cdot S_{res}$ , possuindo valores de  $J_{ei}$  maiores que o valor de  $t_{crítico}$  para  $n-2$  graus de liberdade. A cada valor discrepante excluído, aplicou-se novamente o MMQO, sendo que a exclusão desses valores não deve ultrapassar 2/9 do número original de dados (Souza e Junqueira, 2005).

Há alguns testes para a detecção de *outliers* em regressão, como exemplo o teste de distância de Cook, o teste de resíduo padronizado e o teste padronizado de Jacknife. O teste padronizado de Jacknife representa uma melhoria em relação ao teste de resíduo padronizado, principalmente se houver *outlier* de valor extremo.

A Figura 7 apresenta os gráficos de resíduos para as curvas de calibração em branco analítico e para aquelas construídas por adição de padrão aos digeridos da amostra, para cobre.

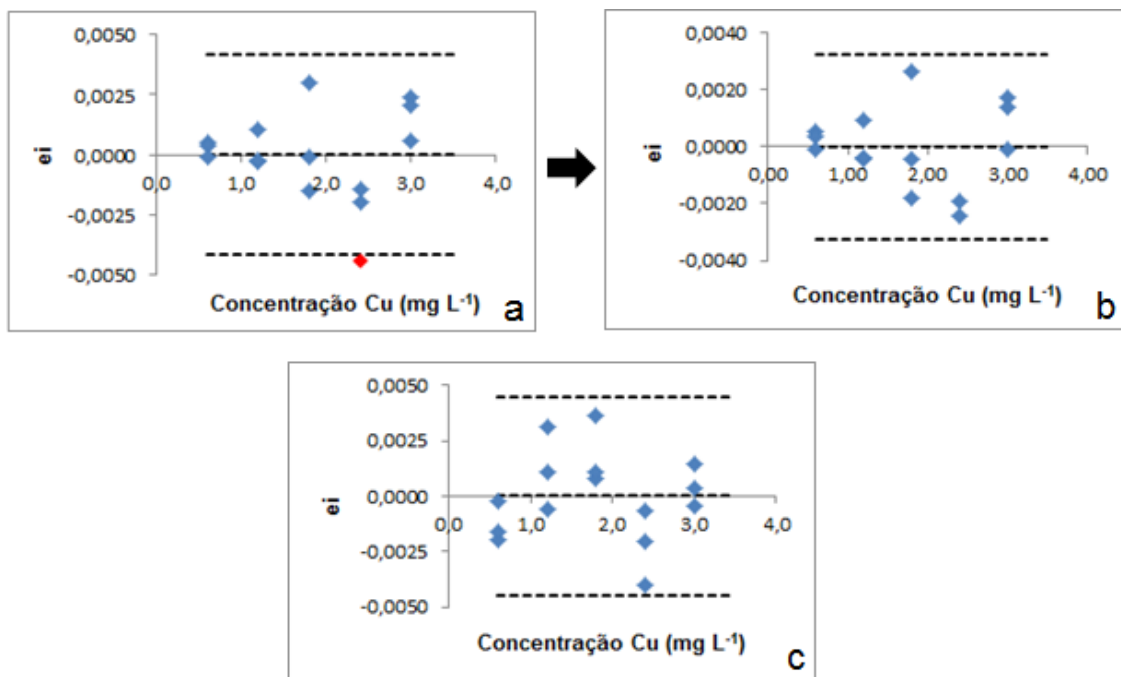


Figura 7. Gráfico de resíduos vs concentração de Cu para as curvas analíticas preparadas em: branco analítico (a e b) e em meio dos digeridos (c).

No gráfico apresentado em (a) é possível verificar um valor discrepante em concentração 2,4 mg L<sup>-1</sup> de Cu na curva construída em branco analítico. Esse valor foi considerado *outlier* pelo teste de Jackknife, pois seu valor de  $J_{ei}$  (3,109) foi superior ao valor de  $t$  crítico igual a 2,160, ao nível de 95% de confiança. Após a remoção desse valor os parâmetros do MMQO foram novamente estimados e não houve a detecção de novos valores discrepantes, como mostrado no gráfico ilustrado em (b). Não foram detectados valores discrepantes para a curva de Cu em meio ao digerido como pode ser observado no gráfico em (c).

A Tabela 11 apresenta a avaliação das demais premissas que devem ser checadas para se estabelecer a linearidade. Os cálculos foram realizados de acordo com as recomendações de Souza e Junqueira, 2005.

A distribuição normal dos resíduos ( $p > 0,10$ ), que é pré-requisito para aplicação de estatística paramétrica, foi confirmada através do teste de Ryan-Joiner. Como mostrado na Tabela 11, os desvios da normalidade não foram significativos, pois os coeficientes de correlação (R) obtidos de 0,9819 e 0,9939 foram superiores aos valores de  $R_{crítico}$  0,9351 e 0,9383, para as curvas em branco analítico e em matriz, respectivamente.

Para a avaliação da homoscedasticidade pode ser usado o Teste de Hartley. Entretanto, tal teste é desvantajoso porque exige que o número de dados dos dois conjuntos que terão as variâncias comparadas seja igual. O teste de Levene é bastante adequado à avaliação de homoscedasticidade quando envolve dados de curvas de calibração, porque é bastante sensível a um conjunto de poucos dados ( $n < 30$ ). Nesse contexto, Brown e Forsythe sugeriram que no teste de Levene se utilizasse a mediana dos dois conjuntos de dados comparados ao invés da média, tornando o teste mais robusto (Souza, 2007).

A estimativa do  $t$  de Levene ( $t_L$ ) permitiu avaliar a homoscedasticidade dos resíduos da regressão (Tabela 11), que foram divididos em dois grupos para aplicação do teste. Quando as variâncias dos resíduos da regressão desses grupos não diferem entre si, ou seja, quando  $t_L$  calculado é menor que o  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$  crítico, os dados podem ser considerados homoscedásticos. Portanto, não foi verificada a heteroscedasticidade dos dados, os valores de  $t_L$  calculados, 1,89 e 0,50, foram inferiores aos valores de  $t_{crítico}$ , 2,16 e 2,179, para as curvas em branco analítico e em digeridos, respectivamente.

Para confirmação da independência dos resíduos foi realizado o teste de Durbin-Watson. Nesse teste, verifica-se se a auto-correlação entre os resíduos é nula, ou seja, se os resíduos não são correlacionados entre si. Caso a covariância não seja nula, aplica-se a regressão generalizada, em que é feita a ponderação pela covariância. Os valores de  $D$  determinados foram 1,757 e 2,388 para as curvas de calibração em branco analítico e em matriz, respectivamente. Tais valores se encontram dentro do intervalo apresentado na Tabela 11, em que é admissível assumir a independência dos dados, em nível de 95% de confiança. Valores de  $D$  abaixo dos limites inferiores indicariam correlação positiva dos dados, para valores de  $D$  acima dos limites superiores uma correlação negativa dos dados seria obtida. Tais limites inferiores e superiores de  $d$  são tabelados e dependem basicamente do número de observações e da probabilidade.

Tabela 11. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Cu.

Cobre			
Premissa avaliada	Estatística	Curva em branco	Curva em matriz
		analítico	
		n=14	N=15
Normalidade	R	0,9819	0,9939
	$R_{\text{crítico}}$ ( $\alpha=0,05$ )	0,9351	0,9383
Homoscedasticidade	$t_L$	1,89	0,50
	$t_{\text{crítico}}$	2,16	2,179
Independência	D	1,757	2,388
	Sem correlação ( $\alpha=0,05$ )	$1,349 < D < 2,651$	$1,359 < D < 2,651$

Os gráficos de probabilidade normal, mostrando os resíduos da regressão ( $e_i$ ) em função do valor normal esperado ( $q_i$ ) e de independência dos resíduos que se encontram distribuídos nos 4 quadrantes, não havendo correlação positiva ou negativa, são apresentados na Figura 8.

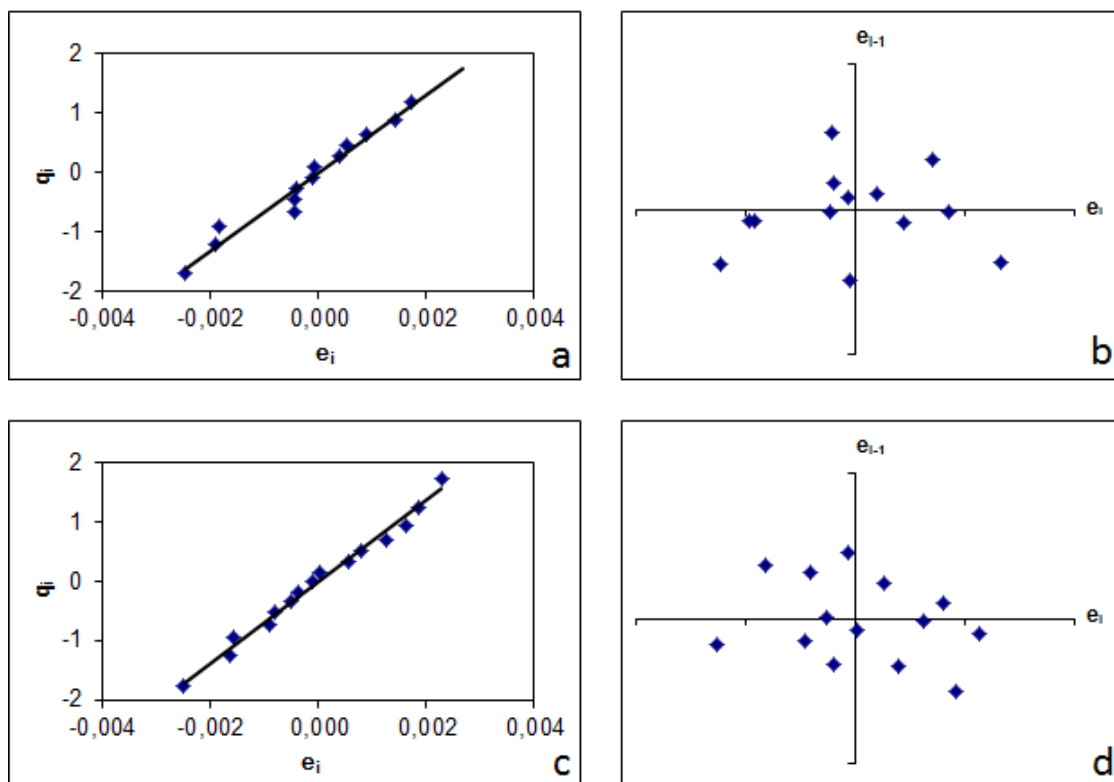


Figura 8. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Cu em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Cu com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$  = valor normal esperado).

Através da análise de variância (ANOVA) nas curvas de calibração nos dois meios considerados, foi confirmada a significância da regressão com desvios da linearidade não significativos, indicando que o MMQO é adequado como modelo estatístico para ajuste dos dados na faixa de concentrações avaliada.

A Figura 9 apresenta as equações da regressão para as curvas em branco analítico e em meio dos digeridos, após exclusão dos valores discrepantes e verificação das premissas da faixa de concentração de Cu avaliada.



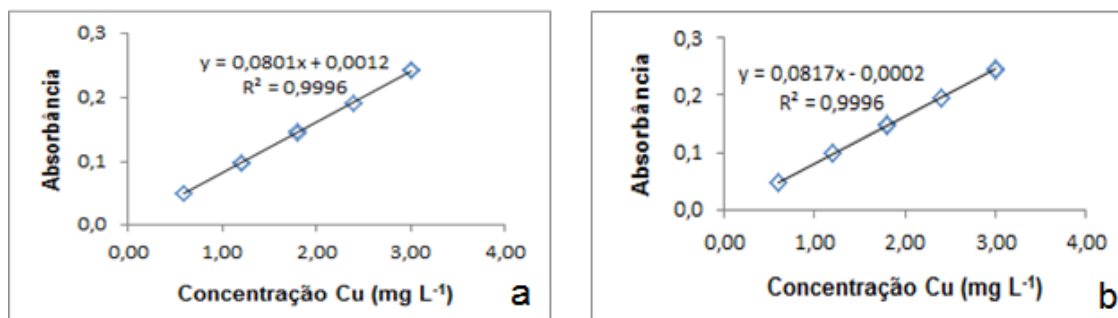


Figura 9. Curvas analíticas de Cu em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos *outliers* e verificação das premissas.

A seletividade foi avaliada em termos de efeito de matriz, após a exclusão de valores discrepantes e verificação das premissas já descritas, para as curvas de calibração construídas em branco analítico e para as curvas de calibração construídas por adição de padrão em determinado volume de digerido (patê de presunto).

A avaliação do efeito de matriz foi realizada através da comparação entre os parâmetros de regressão  $\beta$  e  $\alpha$ , da equação:  $Y_i = \beta X_i + \alpha$ , apresentados na Figura 9. Não houve diferença significativa entre as curvas preparadas em branco analítico e as curvas adicionadas de matriz em nível de 95% de confiança. Assim, as determinações de Cu foram realizadas empregando-se curvas analíticas em meio ao branco analítico, havendo menor consumo de reagentes e diminuição do tempo de preparo.

A Figura 10 apresenta os gráficos de resíduos para as curvas de calibração em branco analítico e para aquelas construídas por adição de padrão aos digeridos da amostra para as determinações de Fe.

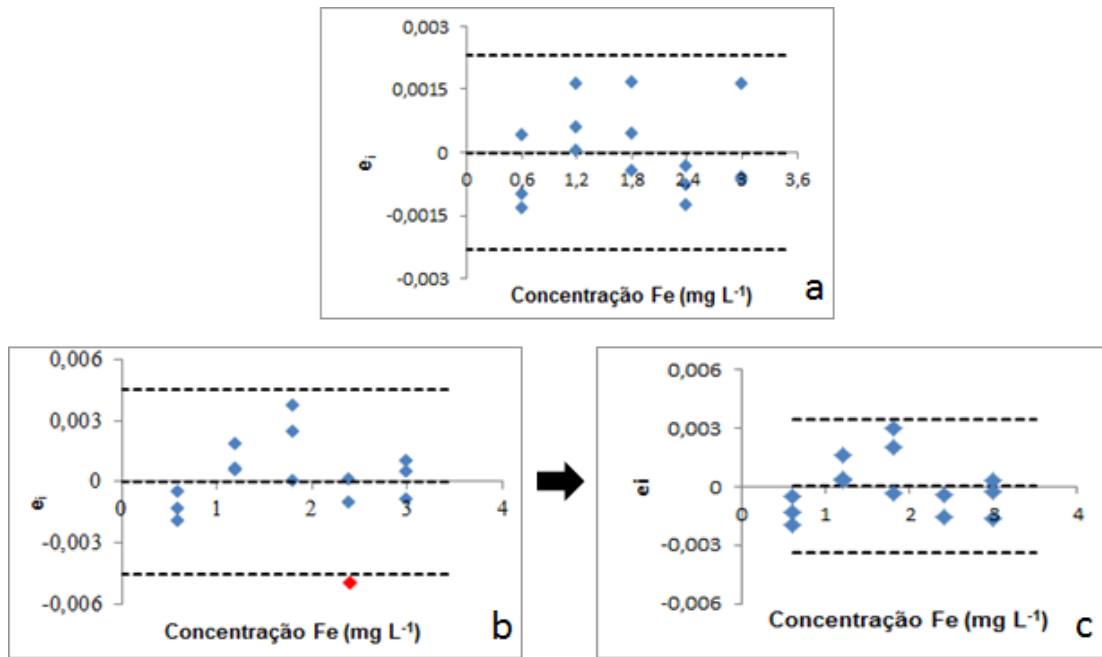


Figura 10. Gráfico de resíduos vs concentração de Fe para as curvas analíticas preparadas em: branco analítico (a) e em meio dos digeridos (b e c).

Nenhum *outlier* foi detectado nas curvas de calibração construídas em branco analítico, como observado no gráfico ilustrado em (a). Para as curvas preparadas em meio do digerido, foi detectado um *outlier* em 2,4  $\text{mg L}^{-1}$  (b), que foi excluído e depois de aplicado novamente o MMQO, nenhum outro valor discrepante foi detectado (c). A Tabela 12 apresenta a avaliação das demais premissas que devem ser cheçadas para se estabelecer a linearidade para as curvas de calibração de Fe.

Tabela 12. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Fe.

Ferro			
Premissa avaliada	Estatística	Curva em branco	Curva em matriz
		analítico	
		n=15	n=14
Normalidade	R	0,9621	0,9656
	$R_{\text{crítico}}$ ( $\alpha=0,05$ )	0,9383	0,9351
Homoscedasticidade	$t_L$	0,695	0,689
	$t_{\text{crítico}}$	2,16	2,179
Independência	D	1,914	1,744
	Sem correlação ( $\alpha=0,05$ )	$1,360 < D < 2,640$	$1,349 < D < 2,651$

Não foram detectados desvios da normalidade, sendo os valores de correlação obtidos (R) superiores aos valores de  $R_{\text{crítico}}$  para as curvas de calibração de Fe preparadas em branco analítico e preparadas em meio dos digeridos.

Os valores de  $t$  de Levene ( $t_L$ ) calculados (0,695 e 0,689) foram inferiores aos valores de  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$  crítico, 2,16 e 2,179 para as curvas em branco analítico e em meio dos digeridos, respectivamente. Não há, portanto, heteroscedasticidade nos dados, e os resíduos encontram-se aleatoriamente distribuídos.

Na avaliação da independência dos dados, os valores calculados de D pertenceram ao intervalo no qual se pode assumir que não há correlação positiva ou negativa entre os dados, ao nível de 95% de confiança. Os gráficos de Durbin-Watson mostram resíduos distribuídos entre os quatro quadrantes, não havendo correlação positiva ou negativa.

A Figura 11 apresenta os gráficos de probabilidade normal e os gráficos de Durbin-Watson para as curvas de calibração de Fe preparadas nos dois meios.

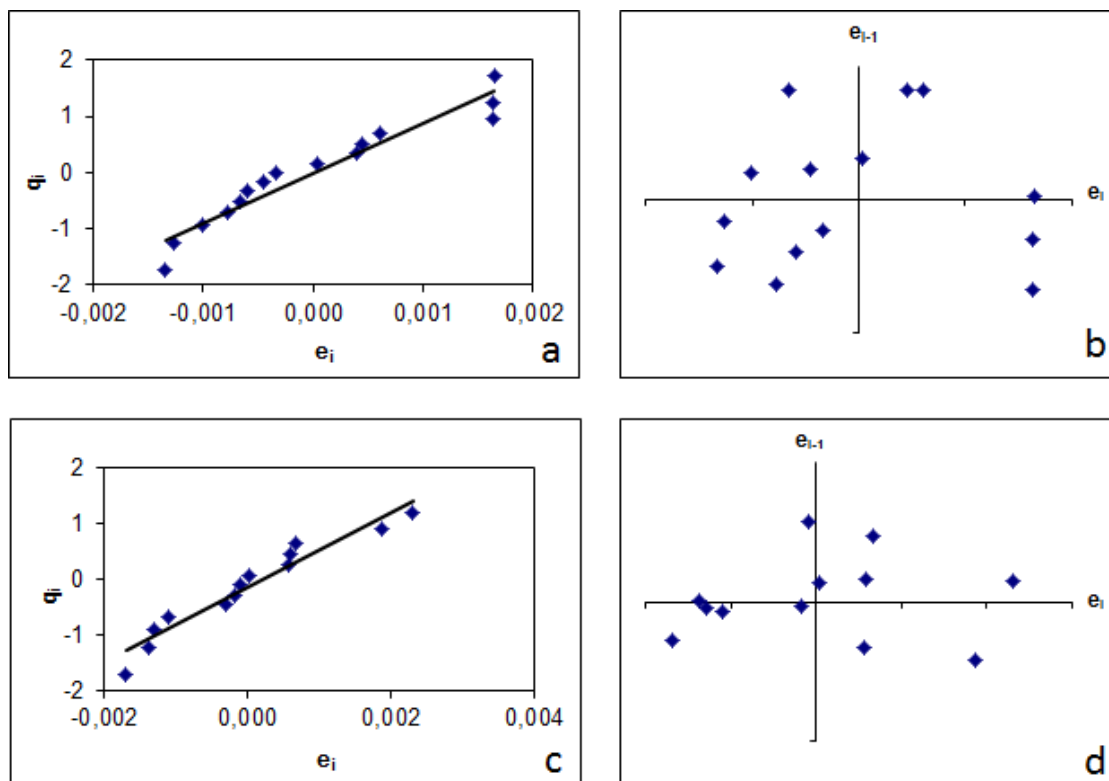


Figura 11. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Fe em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Fe com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$  = valor normal esperado).

Através da análise de ANOVA nas curvas de calibração nos dois meios considerados, foi confirmada a significância da regressão com desvios da linearidade não significativos, indicando que o MMQO é adequado como modelo estatístico para ajuste dos dados na faixa de concentrações avaliada.

A Figura 12 apresenta as equações da regressão para as curvas em branco analítico e em meio dos digeridos, após exclusão dos valores discrepantes e verificação das premissas da faixa de concentração de Fe avaliada.

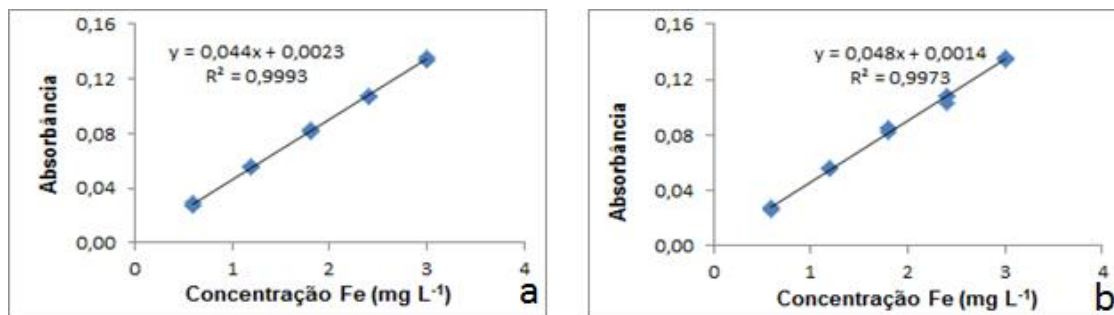


Figura 12. Curvas de analíticas de Fe em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos *outliers* e verificação das premissas.

Os parâmetros das equações de regressão das curvas de calibração apresentadas na Figura 12 foram comparados ao nível de 95% de confiança e não foram detectadas diferenças significativas entre elas, ou seja, não foram detectados efeitos de matriz. Desse modo, as determinações de Fe foram conduzidas a partir de curvas de calibração em branco analítico.

Na Figura 13 são mostrados os gráficos de resíduos *versus* concentração de Mn, sendo que foi verificado um *outlier* no nível de concentração 0,8 mg L<sup>-1</sup> tanto na curva analítica construída em branco analítico, mostrada em (a), quanto na construída em meio aos digeridos, mostrada em (c). Após nova aplicação do MMQO, não foram detectados outros valores discrepantes, como pode ser visto em (b) e (d). A Tabela 13 apresenta a avaliação das demais premissas que foram checadas para estabelecer a linearidade para Mn.

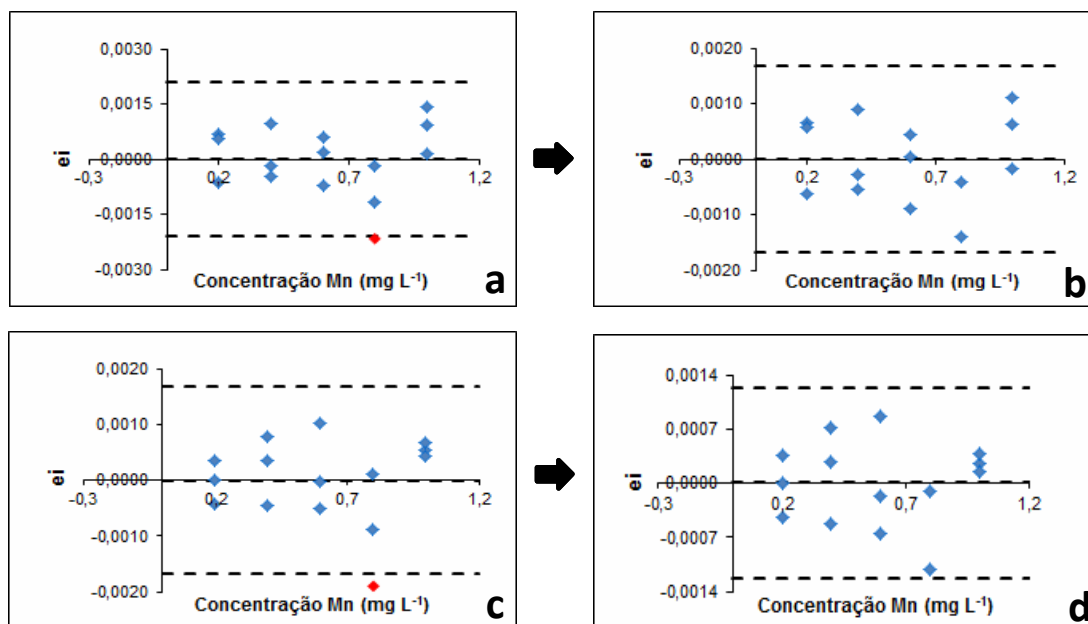


Figura 13. Gráfico de resíduos vs concentração de Mn para as curvas analíticas preparadas em: branco analítico (a e b) e em meio dos digeridos (c e d).

Tabela 13. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Mn.

Manganês			
Premissa avaliada	Estatística	Curva em branco analítico	Curva em matriz
		n=14	n=14
Normalidade	R	0,9538	0,9939
	R <sub>crítico</sub> ( $\alpha=0,05$ )	0,9454	0,9506
Homoscedasticidade	t <sub>L</sub>	0,438	0,247
	t <sub>crítico</sub>	2,16	2,16
Independência	D	1,669	2,341
	Sem correlação ( $\alpha=0,05$ )	1,339 < D < 2,660	1,359 < D < 2,640

Não houve desvios da normalidade ao nível de 95% de confiança, uma vez que os valores dos coeficientes de correlação (R) foram superiores aos valores de  $R_{\text{crítico}}$ , para as curvas analíticas preparadas.

O valor de D determinado para o teste de Durbin-Watson pertenceu ao intervalo que caracteriza a independência dos dados, e os valores de  $t$  de Levene ( $t_L$ ) foram inferiores aos valores de  $t_{\text{crítico}}$ .

Na Figura 14 são mostrados os gráficos de probabilidade normal obtidos para as curvas preparadas nos dois meios. Também são mostrados os gráficos de independência dos resíduos, que se encontram distribuídos nos 4 quadrantes, não sendo verificada correlação positiva ou negativa.

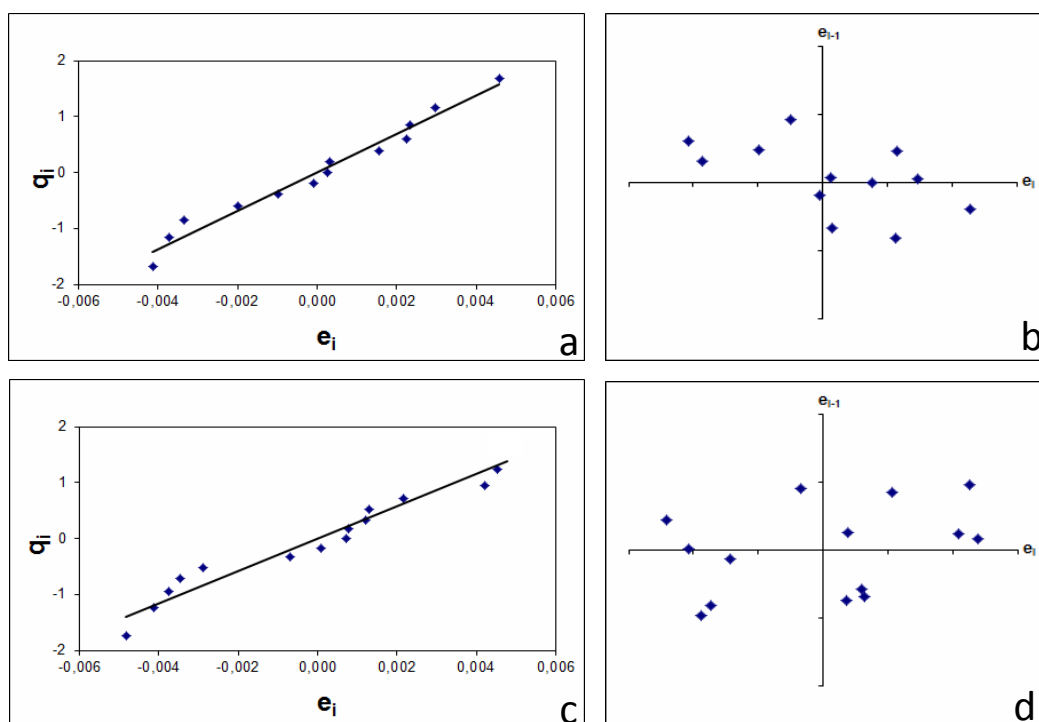


Figura 14. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Mn em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Mn com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$  = valor normal esperado).

Após a exclusão dos *outliers* e avaliação das premissas, as curvas analíticas são mostradas na Figura 15. Os parâmetros das retas de regressão foram comparados em nível de 95% de confiança para avaliação de efeitos de matriz. Não foram detectadas diferenças significativas entre tais parâmetros, e

assim, as determinações podem ser realizadas a partir de curvas preparadas em branco analítico.

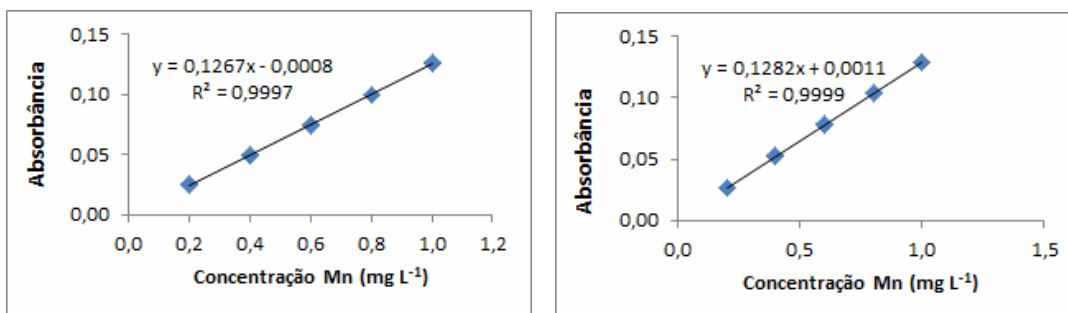


Figura 15. Curvas analíticas em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos *outliers* e verificação das premissas.

Na Figura 16 são mostrados os gráficos de resíduos *versus* concentração de Zn, para as curvas analíticas construídas em branco analítico, havendo a verificação de um *outlier* em 0,8 mg L<sup>-1</sup>, não aparecendo outro valor discrepante após a exclusão desse e nova aplicação do MMQO. Também são apresentados os gráficos de resíduos para as curvas analíticas preparadas em meio dos digeridos, não sendo detectado qualquer valor discrepante nesse caso.



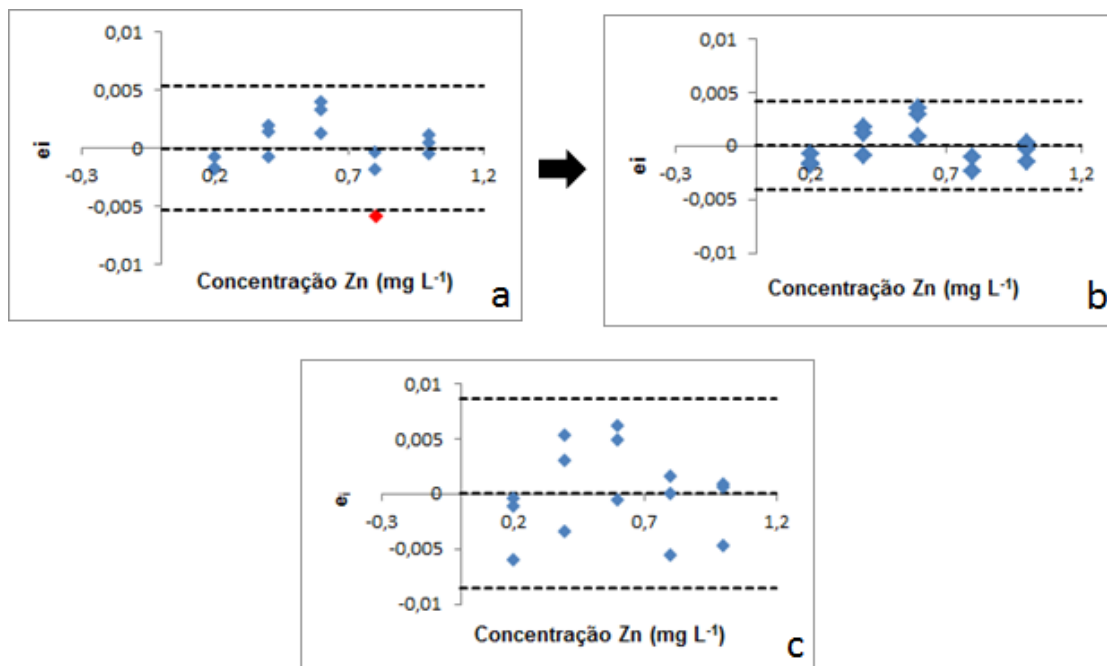


Figura 16. Gráfico de resíduos vs concentração de Zn para curva de calibração preparada em branco analítico (a e b) e preparada em digeridos (c).

A Tabela 14 apresenta a avaliação das demais premissas que foram checadas para estabelecer a linearidade para Zn. Como pode ser visto, não houve desvios da normalidade ao nível de 95% de confiança, uma vez que os valores dos coeficientes de correlação ( $R$ ) foram superiores aos valores de  $R_{\text{crítico}}$ , para as curvas preparadas em branco analítico e por adição de padrão aos digeridos. Além disso, foi verificada a homoscedasticidade dos dados, com os resíduos distribuídos e modo aleatório na faixa de concentração de Zn estudada, sendo os valores de  $t$  de Levene ( $t_L$ ) inferiores aos valores de  $t_{\text{crítico}}$ .

O valor de  $D$  determinado para o teste de Durbin-Watson pertenceu ao intervalo que caracteriza a independência dos dados.

Tabela 14. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Zn.

		Ferro	
Premissa avaliada	Estatística	Curva em branco	Curva em matriz
		analítico n=14	n=15
Normalidade	R	0,9838	0,9833
	R <sub>crítico</sub> ( $\alpha=0,05$ )	0,9275	0,9383
Homoscedasticidade	t <sub>L</sub>	0,328	0,837
	t <sub>crítico</sub>	2,179	2,16
Independência	D	2,004	1,958
	Sem correlação ( $\alpha=0,05$ )	1,330 < D < 2,669	1,359 < D < 2,640

Na Figura 17 são mostrados os gráficos de probabilidade normal obtidos para as curvas preparadas nos dois meios. Também são mostrados os gráficos de independência dos resíduos, que se encontram distribuídos nos 4 quadrantes, não sendo verificada correlação positiva ou negativa.

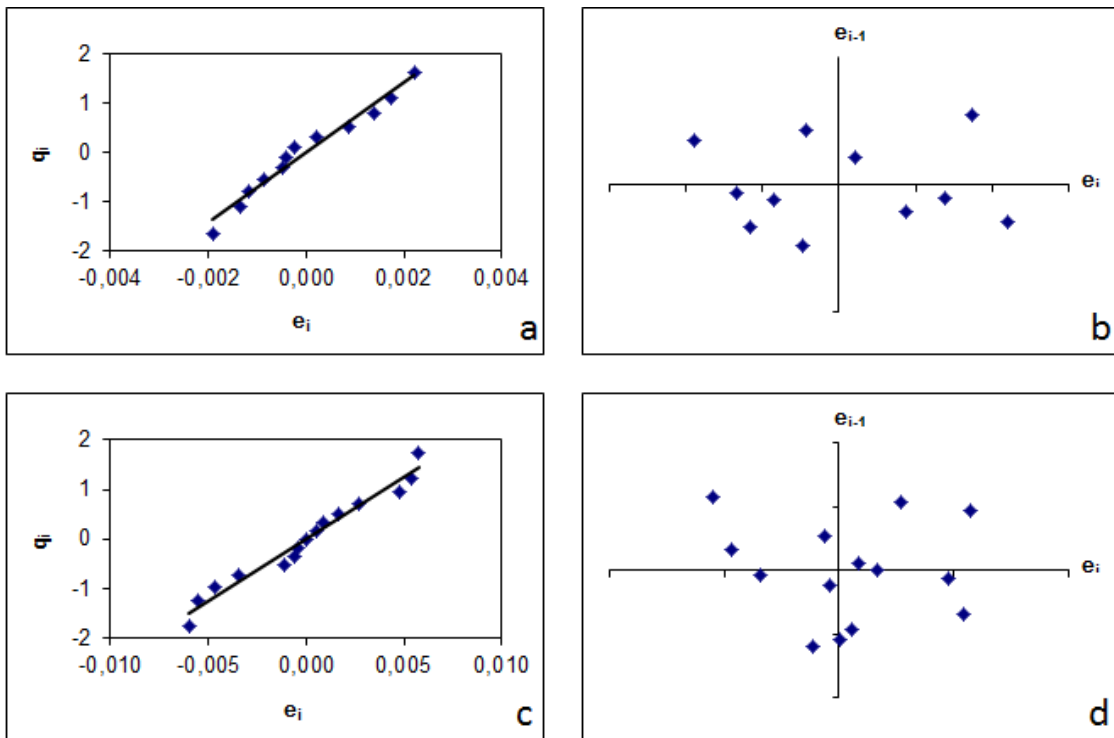


Figura 17. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Zn em branco analítico (a) e (b) e para as curvas analíticas de Zn com adição de padrão aos digeridos (c) e (d), respectivamente. ( $q_i$  = valor normal esperado).

Após a exclusão dos *outliers* e avaliação das premissas, as curvas analíticas são mostradas na Figura 18. Os parâmetros das retas de regressão foram comparados em nível de 95% de confiança para avaliação de efeitos de matriz. Não foram detectadas diferenças significativas entre tais parâmetros, e assim, as determinações podem ser realizadas a partir de curvas preparadas em branco analítico.

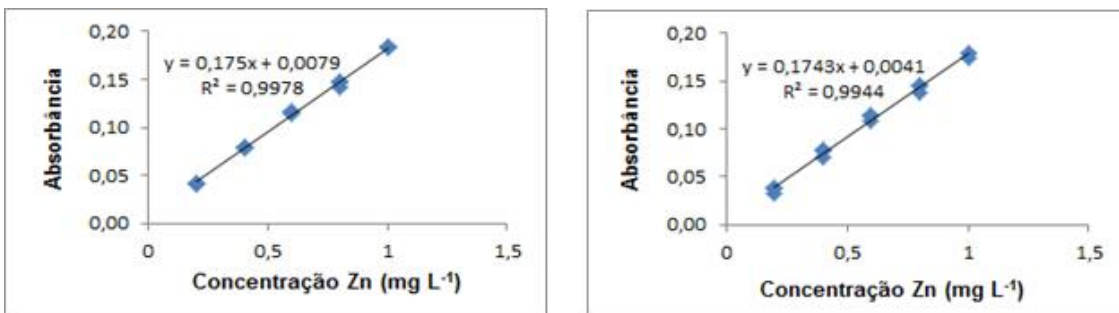


Figura 18. Curvas de analíticas de Zn em: a) branco analítico e b) em meio dos digeridos, após exclusão dos *outliers* e verificação das premissas.

### 5.3.2. Precisão e veracidade

A avaliação da veracidade foi realizada empregando-se dois materiais de referência certificados: fígado bovino (NIST 1577 b) e hepatopâncreas de lagosta (NRCC Tort-2). A Tabela 15 apresenta os resultados determinados e os resultados certificados para esses dois materiais. Além disso, foram também realizados experimentos de recuperação em 3 níveis de concentração.

Os desvios padrão relativos que caracterizam a precisão (repetibilidade e intermediária) foram inferiores a 10% em todos os níveis de concentração dos analitos.

Tabela 15. Concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas por FS FAAS nos materiais certificados de referências digeridos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v v<sup>-1</sup> e solução 3,5 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> (n=3).

Analito	NIST 1577 b (mg kg <sup>-1</sup> )		Tort-2 (mg kg <sup>-1</sup> )	
	Conc.	Conc.	Conc.	Conc.
	Determinada	Certificada	Determinada	certificada
Cu	153,6 ± 0,7	160 ± 8	86,7 ± 1,2	106 ± 10
Fe	182,4 ± 1,1	184 ± 15	74,2 ± 0,6	105 ± 13
Zn	118,3 ± 0,8	127 ± 16	152,0 ± 0,5	180 ± 6

As porcentagens de recuperação obtidas para os ensaios de recuperação, em que os padrões foram adicionados às amostras antes de serem submetidas ao procedimento de digestão, foram adequadas, sendo de 93-98% para o Cu, 97-102% para o Fe, 91-98% para Zn, 92-102% para o Mn.

Para o material de referência certificado de fígado bovino (NIST 1577b) não foram verificadas diferenças significativas entre as concentrações determinadas e as certificadas, através do emprego de testes *F* e *t* ao nível de 95% de confiança. Para o hepatopâncreas de lagosta (Tort-2) as concentrações de Cu determinadas e as certificadas não diferiram entre si ao nível de 95% de confiança. Já para as concentrações determinadas de Fe e Zn, não foram estatisticamente diferentes das certificadas, apenas ao nível de

99% de confiança. Vale ressaltar que foram observados problemas de umidade e homogeneidade da amostra, sendo a mesma submetida à etapa de secagem em estufa antes da etapa de digestão. Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia, a combinação entre veracidade e precisão é chamada de exatidão, porque esta seria a concordância total entre o valor verdadeiro e o resultado, envolvendo erros sistemáticos e aleatórios (INMETRO, 2012).

### 5.3.3. Limites de detecção e quantificação

A Tabela 16 apresenta os limites de detecção e quantificação determinados, segundo o guia de validação da IUPAC.

Tabela 16. Limites de detecção e quantificação calculados para Cu, Fe, Mn e Zn.

Analito	Limite de detecção (mg kg <sup>-1</sup> )	Limite de quantificação (mg kg <sup>-1</sup> )
Cu	1,1	3,4
Fe	2,1	6,8
Mn	1,4	4,9
Zn	0,7	2,4

Os limites de detecção e quantificação foram determinados utilizando-se o desvio padrão das concentrações calculadas para as medidas de 10 brancos analíticos, preparados de modo independente, e o coeficiente angular da curva de calibração utilizada.

### 5.4. Aplicação do método analítico a outras amostras de patês

O método desenvolvido e validado foi aplicado a outras amostras de patês encontradas em supermercados de Belo Horizonte. As concentrações de Cu e Mn determinadas ficaram abaixo do limite de quantificação da técnica. A Tabela 17 apresenta as concentrações de Fe e Zn determinadas.

Tabela 17. Concentrações de Fe e Zn determinadas em outras amostras de patês comerciais.

Patê	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
Atum	30,5 ± 0,9	9,5 ± 0,3
Atum com azeitonas	19,1 ± 0,7	34,0 ± 0,3
Frango	17,2 ± 0,6	11,2 ± 0,2
Frango com miúdos (fígado e coração)	40,2 ± 1,0	79,6 ± 3,2
Peito de peru 1	13,2 ± 0,3	27,2 ± 0,6
Peito de peru 2	29,9 ± 1,0	72,2 ± 1,1
Presunto	21,1 ± 2,8	105 ± 2

Como mostrado na Tabela 17, a maior concentração de Fe foi determinada na amostra de patê de frango com miúdos, certamente em função de o fígado ser um órgão acumulador, como já mencionado anteriormente. As maiores concentrações de Zn foram determinadas nas amostras de patês de presunto (105 ± 2 mg kg<sup>-1</sup>) e de frango com miúdos (79,6 ± 3,2 mg kg<sup>-1</sup>). Para explicar a variação das concentrações deve-se levar em consideração que trata-se de amostras de diferentes fornecedores, diferentes embalagens (plástico e de vidro).

## 6. CONCLUSÕES

Através da comparação da sensibilidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação foi possível concluir que ambos modos de operação do espectrômetro (monoelementar e sequencial) fornecem resultados similares. Sendo assim, é indicado operar o equipamento de modo sequencial, havendo redução de tempo de análise e conseqüente aumento da frequência analítica, além de redução do consumo de amostras.

O método desenvolvido apresentou adequada exatidão (precisão + veracidade) e foi aplicado para a determinação de Cu, Fe e Zn em diferentes tipos de patês.

As concentrações de Cu, Fe e Zn determinadas nos digeridos obtidos a partir da utilização de HNO<sub>3</sub> concentrado e também de solução diluída de HNO<sub>3</sub> (3,5 mol L<sup>-1</sup>) foram estatisticamente comparadas (testes *F* e *t*), ao nível de 95% de confiança, e não foram observadas diferenças significativas entre tais concentrações. A eficiência de soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> na decomposição das amostras de patês se deveu ao processo de regeneração, dentro do frasco de reação, sendo adotado o procedimento de decomposição com adição de HNO<sub>3</sub> 3,5 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante auxiliar, uma vez que o forno de micro-ondas utilizado não dispõe de sistema de pressurização com oxigênio.

O uso de soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> é recomendável haja vista os crescentes avanços da química verde, em que devem ser buscados o menor consumo de reagentes concentrados e a geração de resíduos menos ácidos e, portanto, mais facilmente neutralizados. Além desses fatores, o uso de ácido diluído aumenta a segurança do analista na etapa de preparo de amostras sendo também obtidos menores valores de branco analítico, se comparados aos obtidos quando são empregadas soluções concentradas de ácido.

Apesar da clara necessidade de métodos analíticos validados, em função de técnicas cada vez mais sensíveis e legislações mais exigentes, os procedimentos e critérios de aceitabilidade para os parâmetros avaliados e ferramentas que devem ser utilizadas no tratamento dos dados ainda não são bem definidas, tampouco há um consenso internacional sobre o assunto.

Portanto, é necessário que sejam despendidos esforços na realização da etapa de validação, no sentido de se aplicar testes mais adequados à população de amostras considerada, bem como de se avaliar figuras de mérito de acordo com o tipo de ensaio considerado: intralaboratorial ou interlaboratorial.

É importante ressaltar que a admissão do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) como único critério para avaliação da linearidade deve ser revista. Tal avaliação deve abranger a exclusão de outliers, e confirmação de premissas relacionadas à normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos.



## Capítulo 2 – Desenvolvimento de método de determinação sequencial de Cd e Pb em amostras de patês por TS-FF-AAS e avaliação da utilização de nanotubos de carbono de parede múltipla em etapa de pré-concentração dos analitos

### 7. INTRODUÇÃO

Técnicas espectrométricas tais como FAAS, GFAAS e ICP OES são mais largamente empregadas na determinação elementar em diferentes tipos de amostras tais como águas, solos, sedimentos, bebidas e alimentos. Dentre elas, a FAAS é a mais utilizada em laboratórios de rotina para determinação de elementos traço presentes em concentrações na faixa de  $\text{mg L}^{-1}$ , devido principalmente à sua robustez, seletividade e custos relativamente baixos de aquisição e manutenção do equipamento (Vandecasteele e Block, 1997).

Devido aos efeitos adversos de alguns contaminantes em seres humanos, animais e ecossistemas, são demandados por autoridades governamentais e agências reguladoras, o controle e avaliação dos níveis de elementos tóxicos presentes em baixas concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$  ou inferior) em diferentes matrizes, tais como ambientais e alimentares (Latorre *et al.*, 2012).

Um exemplo de iniciativa governamental é o Regulamento técnico do MERCOSUL sobre os limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, que contempla os limites de Cd e Pb em carnes de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral, sendo iguais a 0,05 e 0,1  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Quando se trata de amostras de fígado desses animais, tais limites são iguais a 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$  para Cd e Pb, já que se trata de um órgão reconhecidamente acumulador de toxinas (MERCOSUL, 2011).

Vários arranjos instrumentais montados no espectrômetro com chama foram desenvolvidos no intuito de superar as limitações da FAAS e tornar possível a determinação elementar na faixa de concentração de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Uma das alternativas bem sucedidas e factíveis é a espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS, do inglês *Thermospray Flame Furnace Atomic Spectrometry*), desenvolvida em 2000 por

Gáspár e Berndt. Este arranjo possibilitou uma melhora de sensibilidade para 17 elementos (Ag, As, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, In, K, Pb, Pd, Rb, Sb, Se, Te, Tl e Zn). Nesta técnica, um tubo atomizador de Ni é acomodado sobre o queimador do espectrômetro e a amostra é introduzida no tubo através de um capilar cerâmico e levada até o tubo atomizador com o auxílio de uma bomba peristáltica. A maior sensibilidade em relação à FAAS convencional é devida ao aumento da eficiência da geração do aerossol de amostra e ao maior tempo de residência da nuvem atômica no caminho óptico (Gáspár & Berndt, 2000b).

Para os casos em que havia a necessidade de se determinar concentrações inferiores aos limites de quantificação fornecidos pela TS-FF-AAS, alguns autores recorreram a etapas de pré-concentração envolvendo a complexação de Cd e Pb com agentes quelantes tais como dietilditiofosfato de amônio (DDTP) e pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC), para então adsorver os complexos em colunas preenchidas com materiais adsorventes, tais como espuma de poliuretano, C18 e mistura de fulerenos C60 e C70 (Tarley e Arruda, 2004; Ivanova *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2004; Tarley e Arruda, 2005).

O desenvolvimento na síntese em larga escala dos nanotubos de carbono somado à área superficial específica relativamente grande desses materiais e às suas estabilidades térmica e química fizeram com que os pesquisadores utilizassem tais materiais na extração em fase sólida para detecção e remediação de vários compostos orgânicos, íons metálicos e seus complexos (Pyrzynska, 2010).

Este capítulo apresentará a avaliação e otimização dos principais parâmetros experimentais da determinação sequencial de Cd e Pb em amostras de patês por TS-FF-AAS. Serão também estimadas algumas figuras de mérito tais como linearidade, precisão, veracidade, limite de detecção e limite de quantificação para o método de determinação sequencial de Cd e Pb por TS-FF-AAS. Em seguida, será apresentado um estudo do uso de nanotubos de carbono oxidados em etapa de pré-concentração de Cd, e do uso do complexante DDTP com posterior adsorção dos complexos Cd-DDTP em coluna preenchida com nanotubos não funcionalizados.

## **8. OBJETIVOS**

### **8.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste capítulo foi otimizar os parâmetros instrumentais da espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS) com a finalidade de determinação sequencial de Cd e Pb em digeridos de amostras de patês.

### **8.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar diferentes tubos atomizadores e tempos de aquisição do sinal analítico na etapa de otimização do arranjo instrumental da TS-FF-AAS sequencial.
- Avaliar o potencial uso da técnica TS-FF-AAS para determinação de Cd e Pb em amostras de patês digeridas em forno de micro-ondas com cavidade, com concentrações inferiores aos limites de quantificação fornecidos pela FAAS.
- Avaliar a eficiência de nanotubos de carbono de paredes múltiplas empregados em etapa de pré-concentração dos analitos.
- Avaliar três procedimentos de tratamento dos nanotubos de carbono objetivando maior pré-concentração dos analitos.
- Avaliar o uso do agente complexante dietilditiofosfato de amônio (DDTP) em conjunto com os nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

## 9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 9.1. Alguns arranjos instrumentais desenvolvidos para melhorar a sensibilidade da FAAS

Como apresentado no capítulo 1, a FAAS é a técnica instrumental mais utilizada em laboratórios de pesquisa e de análise de rotina para determinação elementar em diferentes tipos de amostras. Entretanto, sua sensibilidade é limitada principalmente devido ao reduzido tempo de permanência da nuvem atômica no caminho óptico e à ineficiência de nebulização (Welz e Sperling, 1999).

Diante disso, alguns pesquisadores se dedicaram ao desenvolvimento de arranjos que pudessem contornar tais limitações e permitissem determinações em níveis de concentração ainda mais baixos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Alguns desses arranjos confinaram os átomos em tubos atomizadores acomodados sobre o queimador do espectrômetro, com o intuito de aumentar o tempo de residência da nuvem atômica na zona de medida (Matusiewicz, 1997).

O primeiro arranjo a ser considerado é o LPAT (do inglês, *Long-path absorption technique*), desenvolvido em 1963 por Fuwa e Valee. Tratava-se de um arranjo não comercial, proposto logo após a montagem do protótipo de um espectrômetro com chama por Alan Walsh. Neste arranjo, a amostra era nebulizada e atomizada empregando-se um queimador de consumo total para dentro de um longo tubo atomizador, composto por um tubo de quartzo de 91 cm, envolto por um tubo de borossilicato de 99 cm. Os autores mencionados obtiveram sensibilidades 3 vezes melhores para Cd e Zn, em comparação à atomização com chama convencional, porque o tubo sobre o queimador aumentou o tempo de permanência da nuvem atômica na zona de medida e também devido ao prolongamento do caminho óptico. Contudo, o tempo de passagem dos átomos pelo volume de absorção excedia o tempo de vida dos átomos livres, havendo processos de recombinação de átomos. Além disso, o gradiente de temperatura ao longo do tubo e a condensação em suas paredes diminuíram a sensibilidade (Fuwa e Valee, 1963).

Em 1967, Rubeska desenvolveu uma montagem na qual um tubo atomizador de alumina de 45 cm de comprimento, foi colocado dentro de um forno elétrico para que houvesse homogeneidade de temperatura ao longo do tubo atomizador. Foram determinados limites de detecção 10 vezes menores para Cd e Ag e 3 vezes menor para o Pb, em relação à chama convencional. Entretanto, foram verificados severos efeitos de memória devido à absorção dos analitos nas paredes do tubo. Cabe ainda mencionar o fato do arranjo LPAT ser comercialmente inviável, devido ao comprimento do tubo atomizador, que não se encaixava no queimador de um espectrômetro de chama convencional (Rubeska, 1968).

Lau e colaboradores desenvolveram, em 1976, uma montagem denominada WCAT (do inglês, *water-cooled atom trap*) que consistia de um tubo de quartzo conectado a um sistema de resfriamento com água, que foi posicionado sobre o queimador, ligeiramente abaixo do caminho óptico. A amostra era aspirada para dentro do nebulizador dos espectrômetros comercialmente disponíveis e, acima do queimador, foi posicionado um tubo em U. Nessa montagem o feixe óptico não passava dentro do tubo, mas sim acima dele. Os átomos gasosos no estado fundamental eram gerados na chama e condensados na superfície do tubo de sílica resfriado com água. Posteriormente, a água era retirada e o tubo rapidamente aquecido. Desse modo, os átomos que foram pré-concentrados na superfície do tubo eram volatilizados no caminho óptico e a medida de absorção atômica realizada. Tratava-se de um arranjo de menor frequência analítica devido ao tempo gasto na etapa de pré-concentração dos átomos. Além disso, é importante salientar que todas as espécies metálicas presentes na chama eram depositadas no tubo frio, mas liberadas em tempos diferentes à medida que se dava o aquecimento do tubo. Em função do longo tempo despendido na etapa de pré-concentração, ocorria um grande consumo de amostra durante a etapa de aprisionamento de átomos (Matusiewicz, 1997).

Em 1977, Watling apresentou um arranjo denominado STAT (do inglês, *Slotted quartz tube atom trap*), no qual um tubo de quartzo de 10 cm com duas fendas, a superior posicionada a 120° da inferior, foi posicionado sobre o queimador, valendo-se da nebulização pneumática das amostras. Em relação à FAAS foi verificado um aumento de sensibilidade de até 5 vezes para

elementos mais voláteis tais como Cd e Bi, devido ao aumento do tempo de residência da nuvem atômica no caminho óptico. Entretanto, para elementos tais como Cr e Mo, o uso de chamas mais redutoras causou o aparecimento de material particulado dentro do tubo, que por sua vez provocou espalhamento de radiação. Na maioria dos casos, os tubos são feitos de quartzo porque tem alta temperatura de fusão e baixo coeficiente de expansão térmica. Entretanto, esses tubos apresentam tempo de vida limitado, particularmente quando são nebulizadas soluções contendo metais alcalinos e alcalinos terrosos, que reagem com o quartzo (Watling, 1977).

Gáspar e Berndt propuseram em 1999, um novo arranjo denominado *Beam Injection Flame Furnace Atomic Absorption* (BIFF-AAS). Nessa montagem, a amostra foi introduzida numa solução carregadora e impulsionada por uma bomba de HPLC até um capilar restritor (“*nozzle*”), responsável por gerar um jato de amostra em alta velocidade para dentro de um tubo atomizador posicionado sobre o queimador. A atomização da amostra ocorria quando esse fino aerossol entrava em contato com a parede aquecida do tubo atomizador. Os autores avaliaram tubos atomizadores com e sem furos na base em contato com o queimador do espectrômetro. Neste trabalho, a sensibilidade foi de 1,5 a 69 vezes melhor para os elementos estudados, em comparação à técnica com nebulização pneumática convencional. Outros autores avaliaram o uso de bombas peristálticas, diferentes tipos de *nozzles*, com diâmetros internos variando de 15 a 70  $\mu\text{m}$ . Alguns autores mencionaram o entupimento do *nozzle*, causado provavelmente pelo bloqueio do filtro integrado a ele (Gaspar & Berndt, 2000a).

## 9.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico (TS-FF-AAS) e algumas estratégias de pré-concentração dos analitos envolvendo agentes complexantes

Em 2000, Gáspár e Berndt empregaram um aerossol térmico para a introdução de amostras, dando origem à TS-FF-AAS (do inglês, *Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry*). Nessa montagem, um tubo atomizador de Ni com 10 cm de comprimento é posicionado sobre a chama ar/acetileno do queimador de um espectrômetro de absorção atômica. Uma bomba peristáltica é utilizada na propulsão da amostra, que ao invés de viajar em alta velocidade até o tubo atomizador, como na BIFF-AAS, é levada por tubos de tygon até um capilar cerâmico que possui uma das extremidades em contato com um orifício central do tubo atomizador. A extremidade do capilar em contato com o tubo atomizador alcança temperaturas de aproximadamente 900 °C e é responsável pela pronta vaporização da amostra ao atingir essa região. A técnica é efetiva, com aumento considerável de sensibilidade, especialmente para elementos relativamente voláteis (Gaspar & Berndt, 2000b).

No primeiro trabalho publicado empregando a técnica, a completa introdução da amostra e o aumento do tempo de residência dos átomos na zona de medida contribuíram para obtenção de limites de detecção bastante inferiores em relação à FAAS, sendo iguais a 0,19  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cd, 1,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cu, 21  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Hg, 13  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Pb e 5,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Tl, ou seja, 57, 14, 67, 31 e 17 vezes menores para Cd, Cu, Hg, Pb e Tl, respectivamente, quando comparado ao arranjo convencional. (Gaspar & Berndt, 2000b).

Para a determinação de Cd e Pb presentes em concentrações muito baixas, alguns autores uniram a determinação por TS-FF-AAS a procedimentos de pré-concentração dos analitos. Em 2004, Ivanova *et al.* desenvolveram um sistema de pré-concentração em que o agente quelante APDC foi imobilizado dentro de uma coluna C18 de cromatografia líquida e metanol 60% v v<sup>-1</sup> foi utilizado como eluente. Massas de 0,1 g de materiais de referência certificados de plantas e fígado bovino foram digeridas com 20 mL de água régia em chapa aquecedora. Os limites de detecção calculados foram 0,007  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,17  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cd e Pb, respectivamente (Ivanova *et al.*, 2004).

Pereira e colaboradores determinaram Cd e Pb por TS-FF-AAS em amostras de águas empregando uma etapa de pré-concentração desses elementos com APDC e posterior adsorção do complexo formado em 40 mg de mistura de fulerenos. A exatidão do método foi confirmada por comparação com os resultados obtidos por GFAAS e os limites de detecção calculados foram 0,1 e 2,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cd e Pb, respectivamente (Pereira *et al.*, 2004).

Ainda nesse contexto, Tarley e Arruda empregaram a pré-concentração em linha para determinação de Cd previamente complexado com DDTP em amostras de materiais de referência certificados de arroz e fígado suíno. O complexo formado foi adsorvido em uma espuma de poliuretano e, posteriormente eluído com etanol 80% v v<sup>-1</sup>. Os autores avaliaram a influência da massa de adsorvente, concentração de agente complexante, pH de formação do complexo, e fluxos das etapas de pré-concentração e eluição. O limite de detecção atingido foi de 0,12  $\mu\text{g L}^{-1}$  (216 vezes mais sensível em relação a FAAS) (Tarley e Arruda, 2004). O mesmo procedimento foi empregado pelos autores em outro procedimento para pré-concentração de Pb e determinação por TS-FF-AAS em amostras de água e de vegetais. O limite de detecção calculado foi de 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a frequência analítica de 16 determinações por hora. (Tarley e Arruda, 2005).

### **9.3. Nanotubos de carbono como adsorvente na extração em fase sólida**

A determinação de elementos traços em associação com a extração em fase sólida objetiva alcançar o enriquecimento das espécies metálicas e/ou separação da matriz. A escolha do material sólido que preencherá a coluna é um fator crítico para alcançar consideráveis fatores de pré-concentração (Parodi *et al.*, 2011).

Devido à simplicidade, a extração em fase sólida é uma das alternativas preferidas pelos pesquisadores para a pré-concentração de traços de íons metálicos. Materiais sólidos que possuem alta área superficial e boa capacidade de adsorção, tais como resinas de amberlite XAD, sílica gel, zeólitas e espumas de poliuretano têm sido utilizados para esse objetivo. Devido ao desenvolvimento e maior controle das etapas envolvidas na síntese



de nanotubos de carbono, esse material também tem sido utilizado na extração em fase sólida (Chen *et al.*, 2009; Ozcan *et al.*, 2010).

Os nanotubos de carbono são formas alotrópicas do carbono e possuem dimensões nanométricas. Eles podem ser entendidos como uma folha de grafeno enrolada, formando um cilindro de diâmetro nanométrico (Jia *et al.*, 1999).

De acordo com o número de paredes, eles se classificam em: nanotubos de parede simples (SWCNT, do inglês *single walled carbon nanotubes*), que possuem apenas uma camada cilíndrica; nanotubos de paredes duplas (DWCNT, do inglês *double walled carbon nanotubes*), que são formados por dois cilindros concêntricos e de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multi walled carbon nanotubes*), que são constituídos por mais de dois cilindros concêntricos (Trojanowicz, 2006). A Figura 19a apresenta a estrutura individual de uma camada de grafeno e o modo como ela pode se enrolar dando origem ao nanotubo de carbono. Na Figura 19b são mostradas as estruturas de nanotubos de carbono dos tipos SWCNT e MWCNT.

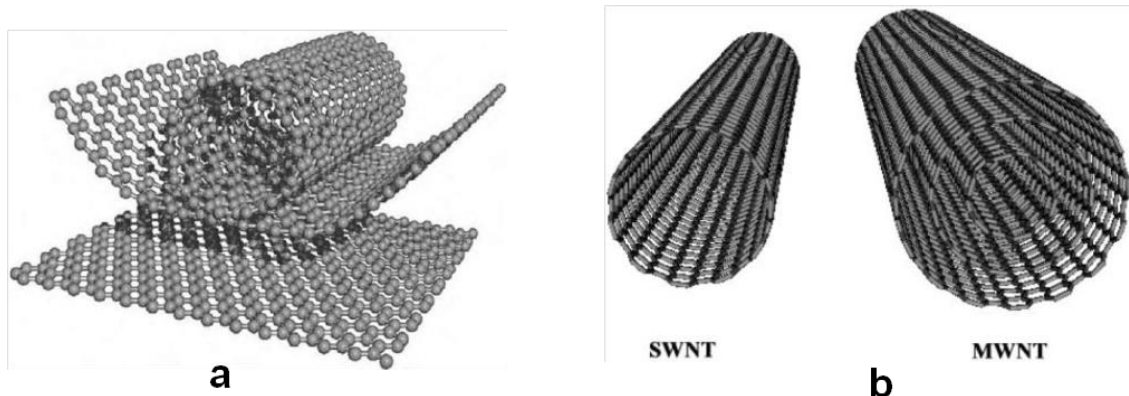


Figura 19. a) estrutura individual de grafite (grafeno) e b) estruturas de nanotubos de carbono de parede simples (SWNT) e de paredes múltiplas (MWNT).

Os nanotubos de carbono possuem propriedades elétricas, ópticas e mecânicas interessantes, e por isso têm sido utilizados na confecção de vários tipos de dispositivos, tais como emissores de elétrons para mostradores, sensores de gases e sensores biológicos, pontas para microscópio de força atômica (AFM). Além disso, quando combinados com outros materiais como

polímeros e fibras, eles formam compósitos com excelentes propriedades mecânicas (Silva *et al.*, 2013).

Entre os adsorventes à base de carbono, os carvões ativados foram certamente os primeiros materiais empregados em extração em fase sólida, usado para remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos em águas e efluentes. A grande área superficial específica, as excelentes estabilidades térmica e química e o recente desenvolvimento na síntese em larga escala, tornaram os nanotubos de carbono uma alternativa interessante de extração em fase sólida para detecção e remediação de vários compostos orgânicos, íons metálicos e seus complexos (Pyrzynska, 2010; Stafiej, 2007).

Tarley e colaboradores construíram uma mini-coluna preenchida com nanotubos de parede múltipla, previamente funcionalizados com HNO<sub>3</sub> concentrado para pré-concentração de Cd em amostras de água e de cigarros. Essa coluna foi colocada em um sistema em fluxo para a determinação de Cd por TS-FF-AAS. A massa de nanotubos usada para preenchimento da coluna foi igual a 30 mg e o pH = 4,9. O tempo de pré-concentração foi de 2 minutos, sob vazão de 5,0 mL min<sup>-1</sup>. A eluição foi realizada com HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> e o eluato diretamente inserido no tubo atomizador de Ni. Os limites de detecção e quantificação para Cd foram 11,4 e 38,1 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em relação à determinação de Cd por FAAS convencional, os autores obtiveram um aumento de sensibilidade de 640 vezes (Tarley *et al.*, 2006).

Os nanotubos quimicamente modificados podem ser usados de forma a facilitar a sua interação com moléculas orgânicas e biológicas, com outros grupos químicos como fármacos ou moléculas tóxicas, e até mesmo com vírus e bactérias, tornando os sensores capazes de detectar pequenos traços da espécie alvo com alta seletividade. O uso de nanotubos de carbono funcionalizados em sensores é uma área muito promissora, entretanto, ainda é um desafio encontrar rotas quimicamente seguras, limpas e factíveis para alterar os nanotubos de carbono que em seu estado natural apresentam reatividade química muito baixa (Souza Filho e Fagan, 2007).

## 10. MATERIAL E MÉTODOS

### 10.1. Amostras e reagentes utilizados

As amostras de patês de atum, frango, fígado, peito de peru e presunto, digeridas em forno de micro-ondas com cavidade, como descrito no capítulo anterior, item 4.5, foram analisadas por TS-FF-AAS operando em modo sequencial, para determinação de Cd e Pb.

Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água deionizada pelo sistema Milli-Q®, modelo Direct-Q3, Millipore (Bedford, EUA). As soluções padrão foram preparadas por sucessivas diluições de soluções estoque monoelementares de Cd e Pb de concentração 1000 mg L<sup>-1</sup> (Titrisol®, Merck, Darmstadt, Alemanha).

No preparo das soluções tampão em diferentes valores de pH foram utilizados ácido cítrico P.A., citrato de sódio P.A. (Isofar, Duque de Caxias, RJ) e tris (hidroximetil) aminometano P.A. (Labsynth, Diadema, SP).

Para o preenchimento das colunas empregadas na etapa de pré-concentração de Cd e Pb foram utilizados nanotubos de carbono (NTC) de parede múltipla, NTC 7000, Nanocyl.

Na oxidação dos nanotubos de carbono foram utilizados os ácidos nítrico e sulfúrico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Na etapa de complexação de Cd foi empregado o reagente dietilditiofosfato de amônio (DDTP) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

Toda vidraria e frascos plásticos foram lavados com água corrente e detergente neutro, enxaguados com água deionizada e deixados em banho ácido (HNO<sub>3</sub> 10% v v<sup>-1</sup>) por um período mínimo de 24 h.

## 10.2. Equipamentos e acessórios

As etapas de avaliação dos parâmetros instrumentais da TS-FF-AAS para determinação sequencial de Cd e Pb, a caracterização e oxidação dos nanotubos de carbono, bem como a utilização destes na etapa de pré-concentração, envolveram a utilização dos seguintes equipamentos e acessórios:

- Micropipetas de volumes variáveis (Transferpette, Wertheim, Alemanha);
- balança analítica modelo AX 200 com sensibilidade de 0,0001 g (Shimadzu do Brasil Comércio LTDA, São Paulo, Brasil);
- pHmetro digital modelo 610 (Marte, São Paulo, Brasil);
- banho ultrassônico;
- colunas de vidro com diâmetro interno igual a 0,5 cm e comprimento igual a 3 cm.

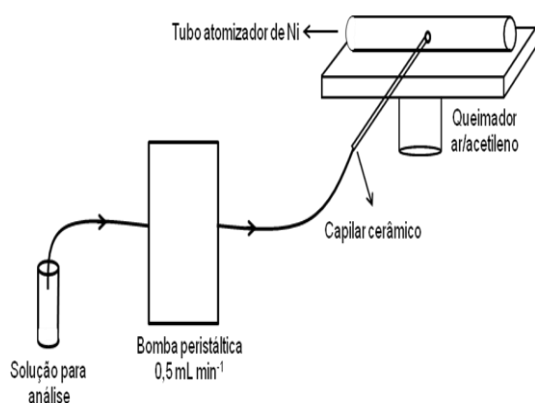
O arranjo instrumental da TS-FF-AAS foi montado em um espectrômetro de absorção atômica com chama, operando em modo sequencial modelo Spectra AA 240FS (Varian, Austrália) e equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco monoelementares de Cd e Pb (Hitachi, Tokio, Japão). Os parâmetros instrumentais adotados nas determinações de Cd e Pb são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros instrumentais adotados na determinação de Cd e Pb por TS-FF-AAS operando em modo sequencial.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Resolução espectral (nm)	Corrente da lâmpada de cátodo oco (mA)
Cd	228,8	0,5	5,0
Pb	283,3	0,5	10

O sistema TS-FF-AAS é constituído por uma bomba peristáltica, responsável pela propulsão das soluções até o tubo atomizador de Ni, que está posicionado sobre o queimador ar/acetileno do espectrômetro de absorção atômica, operando em modo sequencial rápido. Na montagem do sistema mostrado na Figura 20a e 20b foram utilizados:

- bomba peristáltica de 4 canais (Ismatec, tipo ISM 945, Suíça);
- tubos de Tygon<sup>®</sup> de diferentes diâmetros internos;
- tubos de polietileno usados para ligar o tubo de Tygon ao capilar cerâmico em contato com o tubo atomizador;
- suporte de aço inoxidável (mostrado na Figura 21a) confeccionado para acomodar o tubo atomizador no queimador ar/acetileno do espectrômetro de absorção atômica com chama;



a)

b)

Figura 20. a) Esquema da montagem da TS-FF-AAS multielementar e b) sistema em operação com o tubo atomizador acomodado no queimador sobre o suporte de aço inox.

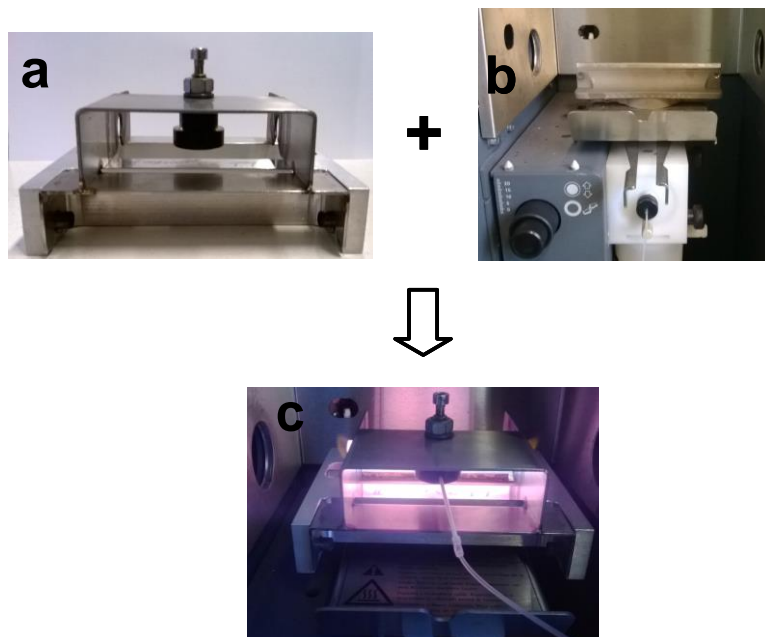


Figura 21. a) Suporte em aço inoxidável no qual é encaixado o tubo atomizador de Ni; b) queimador ar/acetileno do espectrômetro de chama e c) arranjo em operação, suporte encaixado no queimador do equipamento.

No arranjo instrumental da TS-FF-AAS, seja monoelementar ou multielementar sequencial, as soluções alcançam o tubo atomizador percorrendo um capilar cerâmico que possui uma das extremidades em contato com o tubo de Ni. Foram avaliados um capilar cerâmico de 10 cm de comprimento (0,5 mm d.i. e 2,0 mm d.e.) e outro capilar cerâmico de 12 cm de comprimento (1,0 mm d.i. e 2,5 mm d.e.). As extremidades desses capilares foram introduzidas aproximadamente 1 mm dentro do tubo atomizador de Ni, através do orifício central do tubo. O capilar de 12 cm de comprimento avaliado pertence ao sistema de aquecimento de um equipamento GC-MS. Para o capilar cerâmico de maior diâmetro externo foi necessário o desgaste da superfície externa da extremidade para permitir a sua introdução no tubo atomizador.

Para a caracterização dos nanotubos de carbono funcionalizados ou não foram realizadas medidas de termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de transmitância (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para as medidas termogravimétricas foi utilizado o analisador simultâneo TGA modelo Q5000, TA Instruments (New Castle, EUA), com aquecimento de temperatura ambiente até 800 °C, com razão de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> e

sob atmosfera de ar, com fluxo de gás de 100 mL min<sup>-1</sup>. Aproximadamente 5 mg de cada amostra de nanotubos de carbono foram medidas em cadinho de platina.

As medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em microscópio FEI QUANTA 200-FEG, com canhão por emissão de campo. As imagens foram obtidas sob alto vácuo, com *spot* 2, tensão de aceleração entre 5 e 12,5 kV e distância de trabalho de 9,5 mm. A amostra sólida (pó) foi depositada sobre a fita de carbono suportada em *stubs*.

Para as medidas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizado um microscópio FEI TECNAI G2, com canhão termiônico de filamento de tungstênio de 200 kV. A amostra foi preparada dispersando os nanotubos em acetona, com auxílio de ultrassom por 20 minutos. Após a dispersão, uma gota da suspensão foi depositada em uma grade de carbono (Holey Carbon 400 mesh Cu) e as medidas realizadas.

### **10.3. Avaliação do tubo atomizador de Ni e tempo de atraso assumido entre determinações subsequentes**

No arranjo instrumental de determinação monoelementar da TS-FF-AAS, um volume fixo de solução de amostra presente em uma alça de amostragem é introduzido no tubo atomizador através de um injetor comutador. No caso das determinações multielementares sequenciais, a introdução de amostras passa a ser contínua, havendo total preenchimento do tubo atomizador de Ni e obtenção de um sinal contínuo de absorbância, enquanto houver átomos do analito no caminho óptico.

É necessário que antes de se efetuar a determinação subsequente, a linha de base dos analitos determinados sequencialmente retorne a zero. Assim, para que sejam evitados efeitos de memória, o tempo de atraso para início da aquisição do sinal analítico deve ser otimizado.

Foram avaliados 3 tubos de 10 cm de comprimento constituídos de Ni 99% m/m, com orifício central de 2 mm para introdução de amostras, mostrados na Figura 22, e cujas dimensões são apresentadas na Tabela 19. A escolha de um dos tubos atomizadores para as determinações posteriores levou em consideração os sinais de absorbância obtidos para uma solução

multielementar de concentração  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd e  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb. Tais soluções foram escolhidas por se tratarem das concentrações mais altas das curvas de calibração inicialmente consideradas.

Para tal, os sinais analíticos foram acompanhados por um período de 90 segundos, observando-se os maiores valores de absorvância obtidos quando da utilização de cada um dos tubos atomizadores. Além disso, foi também considerado o intervalo de tempo gasto para que o sinal analítico retornasse à linha de base.

Tabela 19. Tubos atomizadores de Ni (10 cm de comprimento) avaliados.

Tubo	Número de furos na base	Diâmetro interno (d.i.) e diâmetro externo (d.e.)
1	6	10 mm (d.i.) e 13 mm (d.e.)
2	10	10 mm (d.i.) e 13 mm (d.e.)
3	10	9 mm (d.i.) e 12 mm (d.e.)

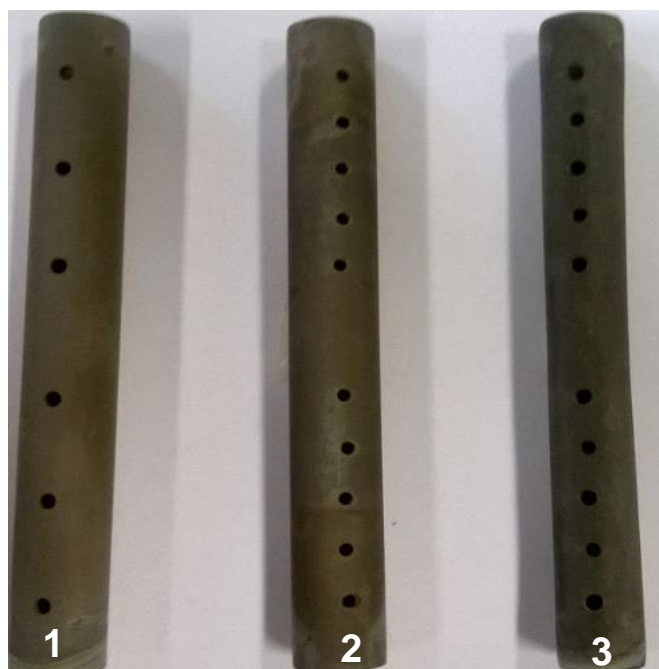


Figura 22. Tubos atomizadores de Ni descritos na Tabela 19.



#### 10.4. Avaliação do intervalo de tempo de aquisição do sinal analítico

Nesta etapa do trabalho foram avaliados 4 tempos de aquisição do sinal analítico: 1, 2, 3 e 4 segundos. Para estabelecimento do melhor tempo a ser utilizado, foi considerado o desvio padrão relativo obtido para a determinação sequencial de 15 soluções multielementares de concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb, representando valores de concentração intermediária dentro da faixa de concentração inicialmente estabelecida.

#### 10.5. Avaliação das figuras de mérito: linearidade, veracidade, limite de detecção e limite de quantificação.

Como descrito no capítulo 1, a avaliação da linearidade foi conduzida por estimativa dos parâmetros do modelo de regressão dos mínimos quadrados, exclusão de *outliers*, checagem das premissas relacionadas à normalidade, independência e homoscedasticidade dos dados e avaliação da significância do modelo e possíveis desvios da linearidade.

Para tal, foram preparadas três curvas de calibração multielementares (Cd e Pb) independentes a partir de soluções intermediárias independentes, para cada nível de concentração. Todas as soluções foram preparadas em  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e os brancos analíticos não foram incluídos nos cálculos, sendo utilizados apenas para ajuste do equipamento. As determinações foram realizadas no mesmo dia em ordem aleatória. A Tabela 20 apresenta os níveis de concentração preparados para Cd e Pb.

Tabela 20. Soluções padrão Cd e Pb empregadas na construção das curvas analíticas para avaliação da linearidade.

Elemento	Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4	Solução 5
	$\mu\text{g L}^{-1}$				
Cd	5,00	10,0	15,0	20,0	25,0
Pb	100	200	300	400	500

Para avaliar a precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foram preparadas 7 soluções independentes contendo Cd e Pb em  $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em três níveis de concentração. O desvio padrão relativo obtido entre as medidas de concentração dessas soluções foi usado para expressar a repetibilidade. Para expressar a precisão intermediária, as mesmas soluções foram preparadas em outro dia e o desvio padrão relativo entre as concentrações determinadas nos dois dias foi usado para avaliar a precisão intermediária.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com o guia de validação da IUPAC.

Como não se dispunha de material de referência certificado com concentrações de Cd e Pb na faixa de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a veracidade do método foi verificada através de ensaios de recuperação em 3 níveis de concentração: 5, 15 e  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cd e 100, 300 e  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para Pb. Neste caso, foi realizada a adição de solução multielementar intermediária a uma amostra branca (patê de presunto), a qual foi submetida ao método de digestão descrito no capítulo 1 (massa de amostra aproximadamente igual a 250 mg, 7 mL  $\text{HNO}_3$   $3,5 \text{ mol L}^{-1}$  mais 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v v<sup>-1</sup>, volume final de digerido completado para 15 mL com água deionizada). A veracidade foi então reportada como a porcentagem de recuperação em relação às concentrações inicialmente adicionadas (IUPAC, 1999). O desvio padrão relativo (DPR) entre as determinações realizadas no mesmo dia foi usado para expressar a repetibilidade. Todo o procedimento foi repetido em outro dia e o DPR entre as determinações realizadas nos dois diferentes dias foi usado para expressar a precisão intermediária.

## 10.6. Procedimentos de oxidação dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e avaliação da eficiência de extração de Cd e Pb

Nesta parte do trabalho foi avaliado o potencial dos nanotubos de paredes múltiplas para serem usados em etapa de pré-concentração. Para tal, colunas de vidro foram preenchidas com esse material previamente oxidado, no intuito de reter os cátions  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  presentes nas soluções utilizadas.

Partindo-se de nanotubos de paredes múltiplas comerciais, foram realizados dois procedimentos de oxidação dos mesmos, na tentativa de inserir grupos carboxilados em sua superfície que atrairiam os cátions dos analitos.

O primeiro procedimento, proposto por Tarley *et al.* em 2006, consistiu em adicionar a uma massa de aproximadamente 500 mg de nanotubos, um volume igual a 30 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Essa mistura foi deixada sob refluxo por 1 h a 120 °C, filtrada em membrana de celulose, lavada com água deionizada até pH próximo a 5 e seca em estufa por 12 h a 100 °C (Tarley *et al.*, 2006).

O segundo procedimento envolveu a funcionalização dos nanotubos utilizando uma mistura ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ ), amplamente citada na literatura, em banho ultrassom por 1h a 45 °C, filtração em membrana de celulose, lavagem com água deionizada até atingir pH próximo a 5 e secagem em estufa por 12 h a 100 °C (Chiang *et al.*, 2011).

Na avaliação de extração partiu-se de uma solução multielementar de Cd e Pb de concentração 10 vezes inferior ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cd e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para Pb) aos limites propostos pelo MERCOSUL. Essa avaliação foi realizada em diferentes valores de pH, utilizando-se soluções tampão de ácido cítrico monoidratado/citrato de sódio diidratado para os valores de pH 3, 4, 5 e 6 e soluções tampão Tris para os valores de pH 7, 8 e 9.

### **10.7. Avaliação da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas oxidados em etapa de pré-concentração de Cd e Pb e posterior determinação por TS-FF-AAS**

Foi realizada uma avaliação do uso de nanotubos de carbono em etapa de pré-concentração de Cd e Pb. Para tal, os nanotubos oxidados como descrito no item 10.6 foram usados como preenchimento de mini-colunas para a pré-concentração de Cd e Pb, que se ligariam aos grupamentos expostos na superfície dos nanotubos, principalmente grupos oxigenados.

O procedimento de pré-concentração, no qual foram empregadas colunas preenchidas com nanotubos oxidados, segundo os procedimentos descritos anteriormente, consistiu das seguintes etapas que foram otimizadas de modo univariado:

- 1) condicionamento da coluna por passagem de 5 mL de solução tampão para cada valor de pH, sob vazão de aproximadamente 3,5 mL min<sup>-1</sup>;
- 2) passagem de 10 mL de solução multielementar 5 µg L<sup>-1</sup> de Cd e 10 µg L<sup>-1</sup> de Pb, através da coluna preenchida com nanotubos oxidados (30 mg), sob vazão de 3 mL min<sup>-1</sup>;
- 3) dessorção com 1 mL de HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>; vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>.
- 4) determinação por TS-FF-AAS.

### **10.8. Avaliação da utilização de nanotubos não oxidados em etapa de pré-concentração de Cd na forma de complexos Cd-DDTP**

Foi avaliado o uso de mini-colunas preenchidas com nanotubos não oxidados, sendo avaliada a eficiência dos mesmos na retenção de prováveis complexos de DDTP com Cd e Pb. Foi avaliado o pH (1 a 9) que favorece melhor pré-concentração dos analitos. Para Pb não foi obtida pré-concentração em qualquer valor de pH avaliado, seguindo-se a avaliação apenas para o Cd.

Inicialmente, avaliou-se o valor de pH do meio que promoveria uma maior taxa de complexação de uma solução 5 µg L<sup>-1</sup> de Cd com 50 µL de solução 0,1 % m v<sup>-1</sup> de DDTP. Em seguida, foram também avaliados os volumes de 100 e 200 µL de solução de DDTP 0,1 % m v<sup>-1</sup>. Por último, foram avaliadas as concentrações 0,3 e 0,5 % m v<sup>-1</sup> de agente complexante.

Após a avaliação do pH, do volume e concentração de complexante, realizou-se o procedimento de pré-concentração que consistiu das seguintes etapas:

- 1) adição de DDTP a 10 mL de solução  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd;
- 2) agitação em vórtex por 20 segundos;
- 3) passagem dessa solução pela coluna (20 mg) de nanotubos não oxidados; vazão  $2 \text{ mL min}^{-1}$ .
- 4) eluição com 1 mL de etanol 80% v v<sup>-1</sup>; vazão  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

### **10.9. Emprego do procedimento de pré-concentração dos complexos de Cd-DDTP em mini-coluna com nanotubos não oxidados**

Após otimização das condições experimentais do procedimento de pré-concentração, este foi aplicado aos digeridos das amostras de patês com valores de pH ajustados para aproximadamente 2.

Não foi promovida a pré-concentração suficiente, seja por interferência dos constituintes da matriz, seja porque a quantidade de Cd presente nas amostras foi baixa, impossibilitando sua determinação por TS-FF-AAS. Para a confirmação da interferência dos constituintes da matriz no sinal de Cd foi realizada a adição de Cd à amostra de patê de presunto que foi submetida ao procedimento de digestão com  $\text{HNO}_3$   $3,5 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v v<sup>-1</sup>, como descrito no item 4.5 do primeiro capítulo. A adição de Cd à amostra considerou o volume final de digerido, tendo-se ao final uma concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd. Os digeridos adicionados de Cd foram submetidos ao procedimento de pré-concentração e foi realizada a determinação de Cd nas frações dessorvidas com etanol 80% v v<sup>-1</sup>.

Para efeito de comparação preparou-se uma solução de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd em  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (n=3) que foi submetida ao procedimento de pré-concentração.

Houve considerável redução do sinal analítico de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd em meio ao digerido. Diante disso, foi possível inferir que os constituintes da matriz interferiram na retenção dos complexos de Cd-DDTP formados na minicoluna de nanotubos. Desse modo, foram preparadas soluções de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd em meio aos analitos Cu, Fe e Zn como interferentes, em 3 níveis de concentração como mostrado na Tabela 21.

Tabela 21. Soluções de interferentes preparadas em três níveis de concentração para avaliação do sinal de 50 µg L<sup>-1</sup> de Cd.

Nível	Concentração dos interferentes (mg L <sup>-1</sup> )
1	Cu (0,40); Fe (0,25); Zn (0,80)
2	Cu (0,80); Fe (0,50); Zn (1,60)
3	Cu (1,60); Fe (1,00); Zn (3,20)

## 11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 11.1. Avaliação do tubo atomizador de Ni e tempo de atraso assumido entre determinações subsequentes

Para avaliar o tempo de atraso que deve ser assumido entre determinações sucessivas, preparou-se uma solução multielementar de concentração 100 µg L<sup>-1</sup> de Cd e 500 µg L<sup>-1</sup> de Pb. O desempenho dos tubos atomizadores de Ni também foi avaliado, utilizando-se para isso os valores de absorvância máxima obtidos para a referida solução multielementar.

Para cada tubo atomizador avaliado, os sinais analíticos para Cd e Pb, foram acompanhados por um intervalo de tempo igual a 90 segundos. Desse modo, foi possível verificar quanto tempo a solução levou para chegar ao tubo atomizador, para preenchê-lo e finalmente gerar um sinal analítico diferente do sinal de ruído. Imediatamente após os 90 segundos de acompanhamento do sinal analítico, foi introduzida uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>, acompanhando o tempo que tal solução chegava ao tubo atomizador e o decréscimo de absorvância até retornar à linha de base. Tal avaliação foi feita para Cd e Pb separadamente, utilizando-se cada um dos 3 tubos atomizadores de Ni.

Vale ressaltar que há na literatura alguns trabalhos que utilizaram tubos atomizadores de materiais cerâmicos (Gáspár e Berndt, 2000b; Petrucelli *et al.*, 2006), ligas metálicas (Gáspár *et al.*, 2002), quartzo (Wu *et al.*, 2006) e Ti (Petrucelli *et al.*, 2006). Entretanto, os sinais obtidos para a maioria dos analitos

determinados foram semelhantes aos obtidos quando se utilizou tubo atomizador de Ni, mais facilmente encontrado, de menor custo e de elevada vida útil, principalmente comparado aos tubos atomizadores de Ti, rapidamente desgastados em contato com a chama.

A Tabela 22 apresenta os valores de absorvância máxima obtidos para 100 µg L<sup>-1</sup> de Cd e 500 µg L<sup>-1</sup> de Pb, para cada um dos tubos atomizadores avaliados.

Tabela 22. Valores de absorvância máxima, tempo de surgimento de sinal analítico distinto do sinal de ruído e tempo de retorno à linha de base para Cd e Pb em relação a cada tubo atomizador de Ni

	Tubo atomizador	Absorvância máxima em 90 segundos	Tempo 1* (segundos)	Tempo 2** (segundos)
Cádmio (100 µg L <sup>-1</sup> )	1 <sup>a</sup>	0,3696	35	35
	2 <sup>b</sup>	0,3290	32	32
	3 <sup>c</sup>	0,3024	30	30
Chumbo (500 µg L <sup>-1</sup> )	1 <sup>a</sup>	0,1615	40	45
	2 <sup>b</sup>	0,1754	38	40
	3 <sup>c</sup>	0,1876	35	35

a: tubo atomizador de 6 furos na base e 10 mm de d.i.; b: tubo atomizador de 10 furos na base e 10 mm de d.i.; c: tubo atomizador de 10 furos na base e 9 mm de d.i..

\*tempo gasto para gerar sinal analítico distinto do ruído.

\*\* tempo gasto para sinal analítico retornar à linha de base.

A partir dos dados apresentados na Tabela 22 conclui-se que a absorvância máxima alcançada é dependente do número de furos na base, que são responsáveis pelo aumento da temperatura no interior do tubo atomizador (Davies e Berndt, 2003). Ainda assim, a temperatura no interior do tubo atomizador não é elevada o suficiente para promover a atomização de elementos menos voláteis (Nascentes *et al.*, 2005).

A absorvância máxima também é dependente do diâmetro interno do tubo atomizador. Como observado por Pereira-Filho e colaboradores, os

maiores valores de absorvância foram obtidos para os tubos atomizadores de menor espessura da parede (Pereira-Filho *et al.*, 2002).

Miranda e Pereira-Filho relataram que o tempo necessário para que a linha de base retorne a zero, ou seja, para que não haja efeito de memória também é dependente das mesmas variáveis (Miranda e Pereira-Filho, 2009).

No caso do Cd, o tempo total mínimo (tempo 1 + tempo 2) que deve ser assumido entre determinações subsequentes foi maior para o tubo 1 (com 6 furos na base), sendo igual a 70 segundos. O maior valor de absorvância também foi obtido para esse tubo atomizador, provavelmente, porque sendo o tubo de menor número de furos na base, houve menor diluição da nuvem atômica pela chama. Sinais de absorvância adequados foram obtidos para Cd quando foram utilizados os três tubos atomizadores.

Miranda descreveu resultados semelhantes, uma vez que reportaram uma diminuição do sinal de absorvância para o Cd quando utilizado um tubo atomizador com maior número de furos na base (Miranda, 2012). Tal fato provavelmente se deve à diluição do vapor de amostra pelos gases da chama e diminuição do tempo de residência no caminho óptico.

O maior número de furos permite uma maior entrada da chama no tubo atomizador e, conseqüentemente, aumenta a temperatura da fase gasosa na zona de medida (Davies e Berndt, 2003). Para o Pb, observou-se um aumento de sinal analítico quando utilizados os tubos atomizadores de 10 furos na base, havendo aumento de sensibilidade devido à maior temperatura alcançada dentro do tubo atomizador.

Quando se utiliza a TS-FF-AAS em modo sequencial é necessário garantir que haja o retorno da linha de base antes de proceder à medida subsequente e, desse modo, o tempo de *delay* assumido deve ser otimizado (Miranda e Pereira-Filho, 2009).

Foi verificado efeito de memória quando se utilizou o tubo atomizador de 6 furos na base para a determinação  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb. Neste caso, a linha de base demorou aproximadamente 45 segundos para retornar a zero, sendo necessário assumir um tempo total de atraso mínimo de 85 segundos, que comprometeria a frequência analítica. A Figura 23 apresenta os perfis dos sinais de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb, considerando-se o tempo 1 (chegada do analito à



zona de medida) e o tempo 2 (decréscimo do sinal até a linha de base retornar a zero).

Para o Pb, Miranda demonstrou que a utilização do tubo atomizador de 6 furos na base causaria um aumento considerável do tempo de delay assumido, havendo efeito de memória (Miranda, 2012).

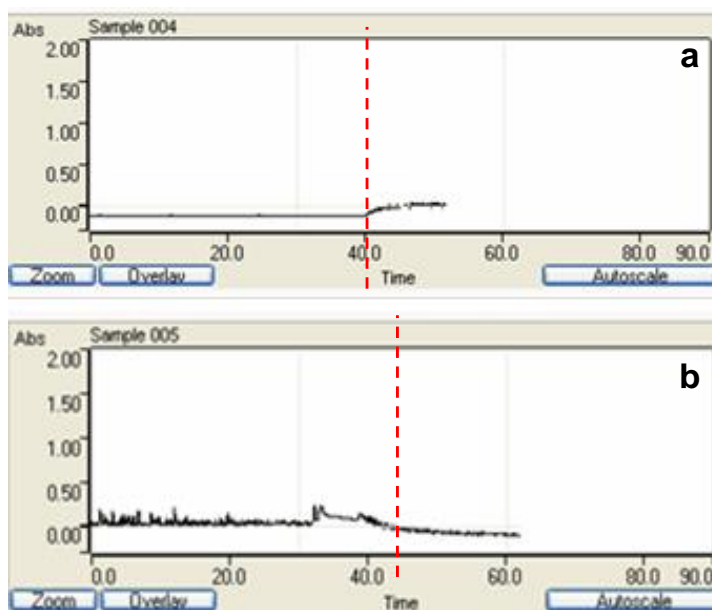


Figura 23. Em a: chegada da solução  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb ao tubo atomizador em aproximadamente 40 segundos; b: introdução de  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  logo após a solução  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb, e retorno da linha de base a zero em aproximadamente 45 segundos.

Para o Cd foram obtidos sinais adequados de absorvância para os três tubos atomizadores, assumindo como tempo de atraso mínimo 60 segundos. Entretanto, para o Pb, o menor tempo de atraso assumido sem efeito de memória foi de 70 segundos quando se utilizou o tubo atomizador 3. Isso se deve ao menor volume interno desse tubo atomizador em relação aos outros dois, que provavelmente diminui o tempo de residência da nuvem atômica e também reduz o tempo necessário para não haver efeito de memória. Soma-se a isso o fato desse tubo atomizador ter parede mais fina, que contribui para maior aquecimento da fase gasosa, favorecendo a vaporização da solução.

Diante disso, o tubo atomizador 3 foi adotado para as demais determinações de Cd e Pb.

É importante salientar que essas determinações foram realizadas admitindo-se  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  de vazão da bomba peristáltica, responsável pela propulsão das soluções até o tubo atomizador. Vazões superiores a essa foram avaliadas com o intuito de diminuir o tempo de *delay* e foi observada uma diminuição da sensibilidade com o aumento da vazão da bomba peristáltica. De acordo com Gáspár e Berndt, quando são empregadas vazões elevadas, o tempo de contato da solução com a extremidade aquecida do capilar é curto e não há eficiente vaporização da amostra, que acaba por atingir o tubo atomizador na forma de um jato líquido, havendo significativa diminuição dos sinais analíticos obtidos (Gáspár & Berndt, 2000a).

O uso do capilar cerâmico de maior diâmetro interno (1 mm) não foi eficiente nas determinações de Cd e Pb, havendo significativa diminuição de sensibilidade. Segundo Gáspár e Berndt, a utilização de capilares cerâmicos de diâmetros superiores a 0,7 mm não é aconselhável, pois prejudica a troca de calor entre a parede do capilar e o fluxo de solução (Gáspár & Berndt, 2000b).

Davies e Berndt concluíram que capilares com diâmetro interno superiores a 0,6 mm produzem um aerossol com alta porcentagem de gotas grandes, que não são totalmente vaporizadas durante o tempo de residência dentro do tubo atomizador. Dessa forma, há um considerável decréscimo na sensibilidade com o aumento do diâmetro interno do capilar cerâmico (Davies e Berndt, 2003).

## **11.2. Avaliação do intervalo de tempo de aquisição do sinal analítico**

Como descrito no item 4.4, o tempo total de aquisição dos sinais analíticos foi avaliado considerando o DPR de 15 soluções multielementares independentes de concentrações iguais a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb.

Na Figura 24 são mostrados os resultados obtidos para DPR em função do tempo de aquisição do sinal.

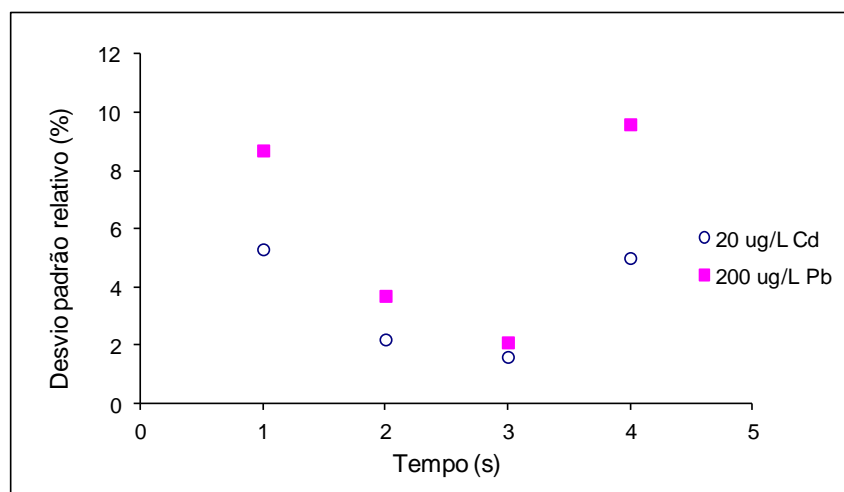


Figura 24. DPR obtidos na determinação de 20 µg L<sup>-1</sup> de Cd e 200 de Pb µg L<sup>-1</sup> versus tempo de aquisição do sinal analítico de 1 a 4 segundos (n = 3).

É possível verificar na Figura 24 que quando considerados intervalos de tempo de leitura iguais a 2s ou 3s a precisão dos resultados foi melhor. Para intervalos de tempo de 1s e 4s observou-se maior dispersão das determinações. Sendo assim, foram assumidos intervalos de tempo iguais a 3s, para os quais foram obtidos os menores valores de DPR.

### 11.3 Avaliação de algumas figuras de mérito: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), veracidade, limite de detecção e limite de quantificação

Para avaliar a linearidade foram construídas três curvas independentes em HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>, como descrito no item 4.5. As premissas referentes à normalidade, independência e homoscedasticidade dos dados, além da detecção dos *outliers* e significância do modelo de regressão linear foram avaliadas. Foram realizados os mesmos testes e procedimentos empregados na etapa de validação descrita no capítulo 1.

Os parâmetros do modelo de regressão por mínimos quadrados ordinários foram estimados e os resíduos foram calculados. Então, para a detecção de *outliers* foi aplicado o método de resíduos padronizados de Jackknife ( $J_{ei}$ ), calculado para cada ponto da curva de calibração. A Figura 25

apresenta os gráficos de *outliers versus* concentração de Cd e Pb. Não foram detectados *outliers* em nenhuma das curvas de calibração.

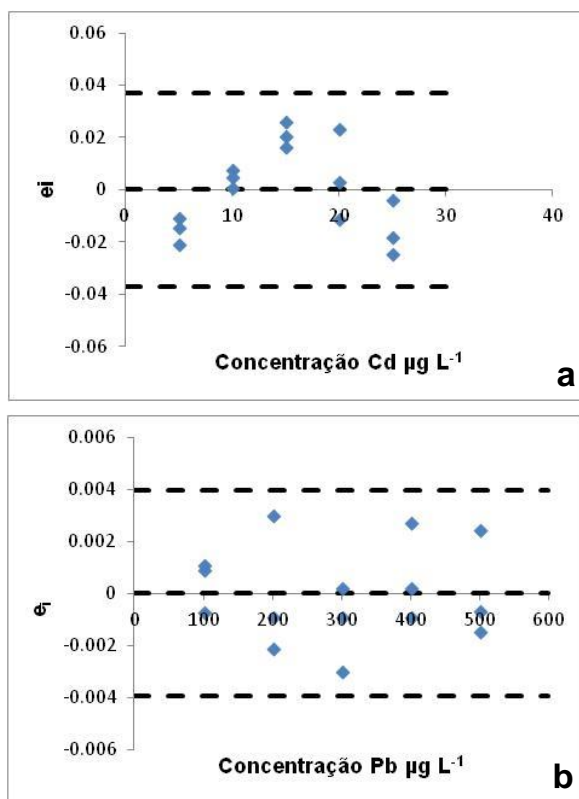


Figura 25. Em a: Gráfico de resíduos vs concentração de Cd; b: gráfico de resíduos vs concentração de Pb para as curvas analíticas preparadas em meio ácido.

As Tabelas 23 e 24 apresentam a avaliação das demais premissas que devem ser checadas para se estabelecer a linearidade para as curvas de calibração de Cd e Pb.

Tabela 23. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Cd.

Cádmio		
Premissa avaliada	Estatística	Curva em HNO <sub>3</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>
		n=15
Normalidade	R	0,9839
	R <sub>crítico</sub> ( $\alpha=0,05$ )	0,9383
Homoscedasticidade	t <sub>L</sub>	0,047
	t <sub>crítico</sub>	2,16
Independência	D	1,55
	Sem correlação ( $\alpha=0,05$ )	1,36 < D < 2,64

A distribuição normal dos resíduos ( $p > 0,10$ ) foi confirmada através do teste de Ryan-Joiner. Os desvios da normalidade não foram significativos, pois o coeficiente de correlação (R) obtido foi igual a 0,9839, sendo superior ao valor do R<sub>crítico</sub> de 0,9383, ao nível de 95% de confiança.

Para avaliar a homoscedasticidade dos dados foi estimado o  $t$  de Levene ( $t_L$ ). Se o valor do  $t_L$  estimado for inferior ao  $t_{crítico}(0,05, n_1+n_2-2)$  conclui-se que não há heteroscedasticidade dos dados. Portanto, sendo o  $t_L$  calculado igual a 0,047 que é inferior ao valor de  $t_{crítico}$  (2,16), pode-se afirmar que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, há homoscedasticidade.

Não foi verificada a dependência entre os resíduos, uma vez que o valor de D do teste de Durbin Watson calculado (1,55) está inserido no intervalo no qual é possível afirmar que os dados são independentes entre si, para  $\alpha=0,05$ .

Tabela 24. Avaliação das premissas envolvidas no estudo da linearidade para as curvas analíticas de Pb.

Chumbo		
Premissa avaliada	Estatística	Curva em HNO <sub>3</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>
		n=15
Normalidade	R	0,9778
	R <sub>crítico</sub> ( $\alpha=0,05$ )	0,9383
Homoscedasticidade	t <sub>L</sub>	0,41
	t <sub>crítico</sub>	2,16
Independência	D	1,93
	Sem correlação ( $\alpha=0,05$ )	1,35 < D < 2,60

O valor do coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, igual a 0,9778, foi superior ao valor de R<sub>crítico</sub> igual a 0,9383 ( $\alpha=0,05$ ), o que confirma a distribuição normal dos resíduos. Não foi verificada a heteroscedasticidade dos dados, uma vez que o t<sub>L</sub> calculado (0,41) foi inferior ao valor de t<sub>crítico</sub> (2,16).

Não foi verificada a dependência entre os resíduos, uma vez que o valor de D do teste de Durbin Watson calculado (1,93) está inserido no intervalo no qual é possível afirmar que os dados são independentes entre si, para  $\alpha=0,05$ .

A Figura 26 apresenta os gráficos de probabilidade normal (a e c), mostrando os resíduos da regressão (e<sub>i</sub>) em função do valor normal esperado (q<sub>i</sub>), em que é possível observar que os resíduos seguem uma distribuição normal. Em (b) e (d) são mostrados os gráficos de Durbin Watson, que descrevem a independência dos resíduos, que se encontram distribuídos nos 4 quadrantes, não havendo correlação positiva ou negativa, para as curvas de calibração de Cd e de Pb.

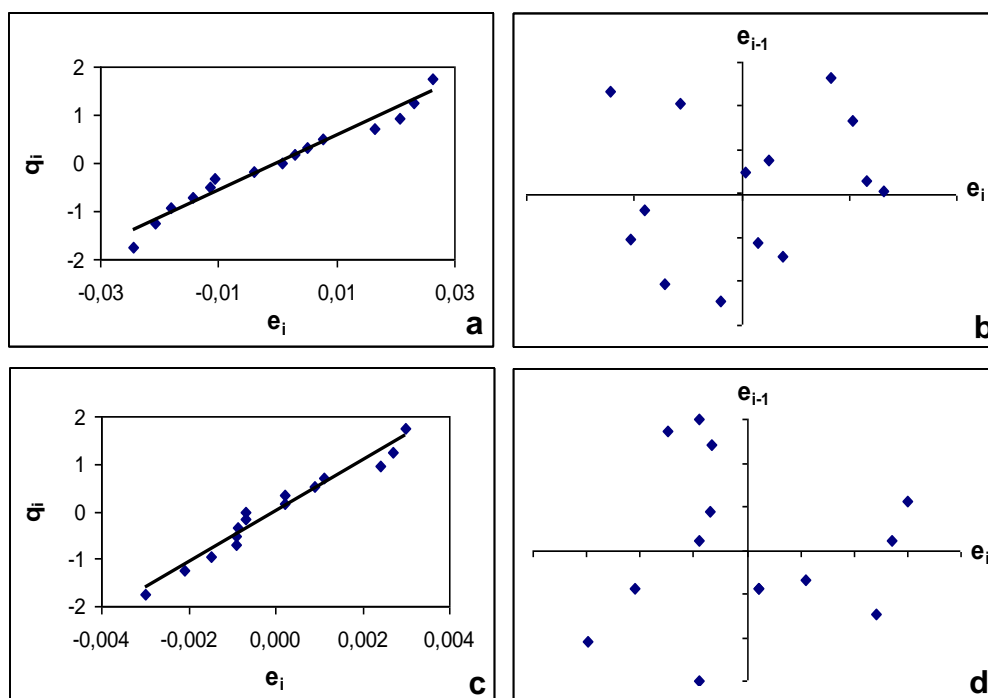


Figura 26. Gráficos de probabilidade normal e de Durbin-Watson para as curvas analíticas de Cd (a) e (b) e para as curvas analíticas de Pb (c) e (d) ( $q_i$  = valor normal esperado).

Como havia material de referência certificado com concentrações de Cd e Pb na faixa de concentração adequada às determinações por TS-FF-AAS, a veracidade foi avaliada através de ensaios de recuperação, utilizando-se matriz branca (patê de presunto) fortificada em 3 níveis de concentração para Cd e Pb, cada nível fortificado em triplicata. A precisão foi avaliada como repetibilidade (expressa como DPR entre determinações de um dia) e como precisão intermediária (expressa como DPR entre determinações de dois dias distintos) das determinações desses digeridos fortificados. A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos na avaliação da veracidade e da precisão.

Tabela 25. Porcentagens de recuperação (%R) e desvio padrão relativo (de repetibilidade e precisão intermediária) em três níveis de concentração de Cd e Pb.

Cádmio		Chumbo	
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	%R $\pm$ DPR (%)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	%R $\pm$ DPR (%)
5	82,4 $\pm$ 7,5	100	81,5 $\pm$ 6,2
5*	85,3 $\pm$ 8,5	100*	79,4 $\pm$ 5,6
15	92,1 $\pm$ 4,3	300	87,8 $\pm$ 3,4
15*	91,7 $\pm$ 3,2	300*	89,5 $\pm$ 2,1
25	96,1 $\pm$ 2,1	500	98,4 $\pm$ 1,1
25*	94,1 $\pm$ 1,8	500*	97,2 $\pm$ 0,8

\* experimentos do segundo dia para avaliação da precisão intermediária

É importante mencionar que a porcentagem de recuperação é dependente da concentração do analito e observa-se uma dispersão maior dos resultados em regiões da curva de calibração onde a concentração é mais baixa (IUPAC, 2002).

A veracidade em termos de porcentagem de recuperação variou de 82,4% a 96,1% para Cd e de 79,4% a 98,4% para Pb. Segundo o manual de garantia da qualidade analítica (MAPA, 2011), para a faixa de concentração aqui considerada, os valores de recuperação são aceitáveis. Os valores de desvio padrão relativo utilizados para a expressão da precisão foram todos inferiores a 10%.

Os limites de detecção calculados foram iguais a 0,054 e 0,192  $\text{mg kg}^{-1}$  para Cd e Pb, respectivamente e os limites de quantificação iguais a 1,41  $\text{mg kg}^{-1}$  para Cd e 4,7  $\text{mg kg}^{-1}$  para o Pb.

As amostras de patês digeridas no capítulo 1 foram analisadas por TS-FF-AAS para determinar Cd e Pb sequencialmente. Para todas as amostras, as concentrações foram inferiores aos limites de quantificação, que são superiores aos limites máximos em carnes de Cd e Pb propostos pelo MERCOSUL (0,05 e 0,1  $\text{mg Kg}^{-1}$  para Cd e Pb, respectivamente).



Foi avaliada a utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, previamente submetidos a procedimentos de carboxilação e utilizados para preencher minicolunas com o intuito de promover a pré-concentração de Cd e Pb. A utilização de minicolunas, preenchidas com nanotubos de carbono não oxidados, através das quais foram passadas soluções contendo Cd e Pb adicionadas de DDTP, também foi realizada.

#### **11.4. Avaliação de procedimentos de pré-concentração de Cd e Pb utilizando colunas preenchidas com nanotubos oxidados e não oxidados**

No intuito de promover a pré-concentração de Cd e Pb antes da determinação por TS-FF-AAS, avaliou-se a possibilidade do uso de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, como material de preenchimento de colunas de extração em fase sólida desses analitos. Na Figura 27 é mostrada uma imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos nanotubos de carbono (nanocyl 7000) sem qualquer tratamento.

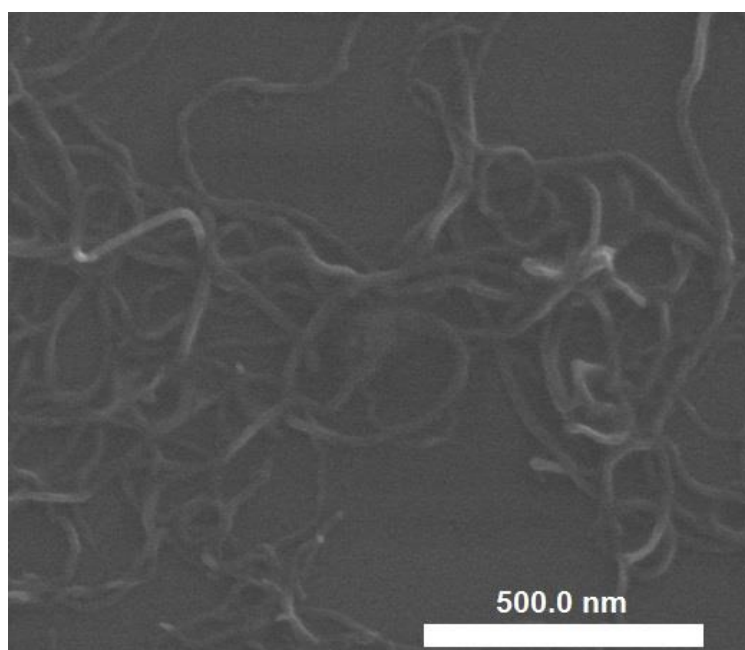


Figura 27. Imagem por microscopia eletrônica de varredura para os nanotubos não modificados em magnitude de 100000 vezes.

A imagem foi obtida com um aumento de 100.000 vezes e é possível observar que os nanotubos aparecem em toda a superfície com tamanhos

variados. Foi observada a presença de impurezas como cristais de catalisadores provenientes da síntese ou outras formas de carbono, o que é coerente com o resultado da TG e aponta para 10% de resíduo.

A Figura 28 apresenta uma imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos nanotubos de carbono.

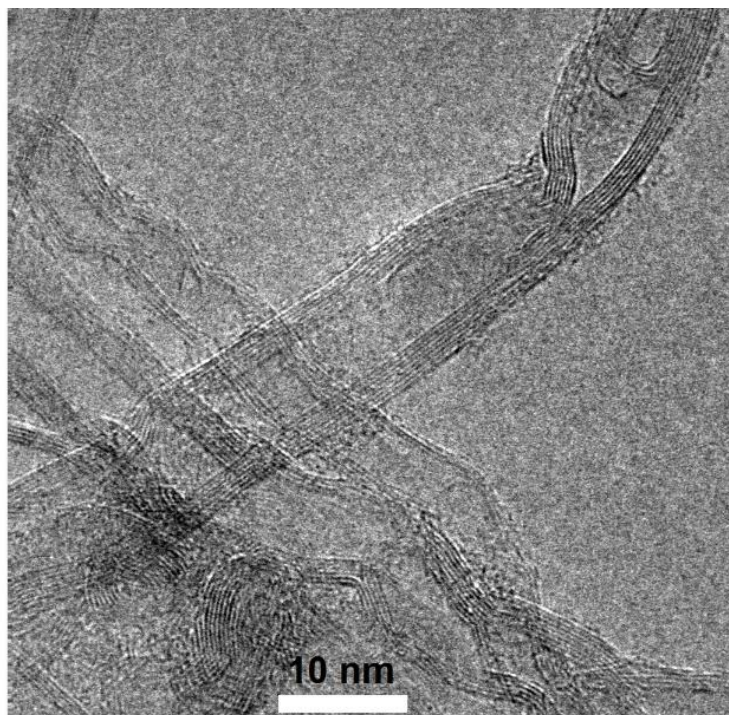


Figura 28. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para os nanotubos não modificados.

É possível observar que se trata de tubos de paredes múltiplas. O comportamento hidrofóbico e a natureza inerte da superfície dos nanotubos de carbono restringem as aplicações desses materiais. Nesse sentido, a funcionalização da superfície dos nanotubos é um método atrativo para aumentar a dispersão desses materiais em soluções aquosas e solventes orgânicos, o que é altamente desejável quando se pretende fabricar polímeros compósitos (Chiang et al., 2011). O aumento da quantidade de grupos ácidos, tais como ácidos carboxílicos, na superfície dos nanotubos diminui seu caráter hidrofóbico e faz com que os metais em solução tenham maior acesso à superfície dos nanotubos (Chiang et al., 2011). Desse modo, nanotubos de

carbono oxidados têm sido avaliados desde 2004 como material empregado em extração em fase sólida de íons metálicos (Méndez *et al.*, 2011).

A oxidação ácida tem sido reportada como um método efetivo para purificar e funcionalizar a superfície dos nanotubos de carbono (Jia *et al.*, 1999). Os reagentes mais comuns usados para promover a oxidação da superfície dos nanotubos de carbono são  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{KMnO}_4$ . Também é utilizado o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , contudo sua eficiência em gerar grupos carbonilas e carboxílicos é mais limitada se comparada aos tratamentos ácidos (Avilés *et al.*, 2009).

Nesse contexto, foram avaliados dois procedimentos de oxidação ácida da superfície dos nanotubos. O primeiro procedimento descrito é uma funcionalização ácida mais branda, utilizando apenas  $\text{HNO}_3$  como reagente oxidante (Tarley *et al.*, 2006). O segundo procedimento envolve uma mistura de  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  amplamente citada na literatura (Avilés *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2011) para funcionalização de nanotubos, objetivando principalmente a melhor dispersão destes em soluções aquosas e solventes polares.

A Figura 29 apresenta as curvas de TG e DTG para os nanotubos sem funcionalização e para os nanotubos funcionalizados em cada um dos métodos.

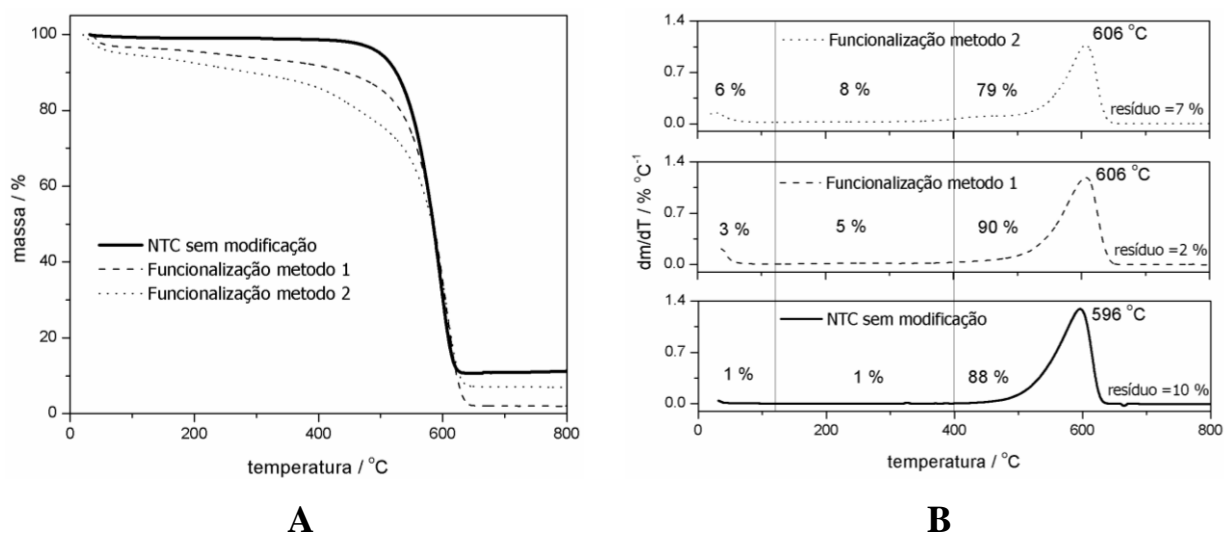


Figura 29. Em a: Curvas TG e b: curvas DTG para os nanotubos de carbono sem modificação e modificados em cada método.

É possível observar que os nanotubos apresentam três quedas características. O primeiro da temperatura ambiente até 120 °C, referente à perda de umidade e possíveis solventes empregados no processo de purificação. O segundo na faixa de temperatura 120 °C a 400°C, referente à perda de funcionalização, e um último de 400°C a 800°C, referente à decomposição dos nanotubos. Na Figura 29b percebe-se que o método 2 foi o que promoveu maior porcentagem de funcionalização (8%), com 7% de resíduo.

Com o método 1 obteve-se uma porcentagem de funcionalização de 5% e baixa porcentagem de resíduo. Percebe-se também que a funcionalização promoveu maior estabilidade térmica do material, uma vez que a temperatura máxima aumentou.

Após a oxidação ácida dos nanotubos de carbono, alguns grupos funcionais tais como ácidos carboxílicos, grupos fenólicos e hidroxílicos são formados na superfície. Logo, o valor de pH da solução que passará através da coluna preenchida com os nanotubos afetará tanto a estrutura desse material adsorvente como também o grau de ionização e capacidade de adsorção dos íons que se deseja pré-concentrar (Méndez *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2009).

Desse modo, foram preparadas soluções multielementares de concentração 5 µg L<sup>-1</sup> e 10 µg L<sup>-1</sup> para Cd e Pb, em diferentes valores de pH (3 a 9) para avaliar em qual valor de pH a adsorção dos cátions aos nanotubos funcionalizados é mais efetiva. Como mencionado no item 4.7, para cada valor de pH avaliado, a coluna de NTC oxidados (m=30 mg) foi condicionada com 5 mL de solução tampão, e em seguida, passou-se a solução de Cd e Pb (vazão 3,5 mL min<sup>-1</sup>), depois foi realizada uma etapa de dessorção por passagem através da coluna de 1mL de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> e por último a determinação de Cd e Pb por TS-FF-AAS da fração dessorvida com 1 mL de HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A Figura 30 apresenta a avaliação de adsorção de Cd (5 µg L<sup>-1</sup>) em função do pH para os dois métodos de oxidação dos nanotubos de carbono.

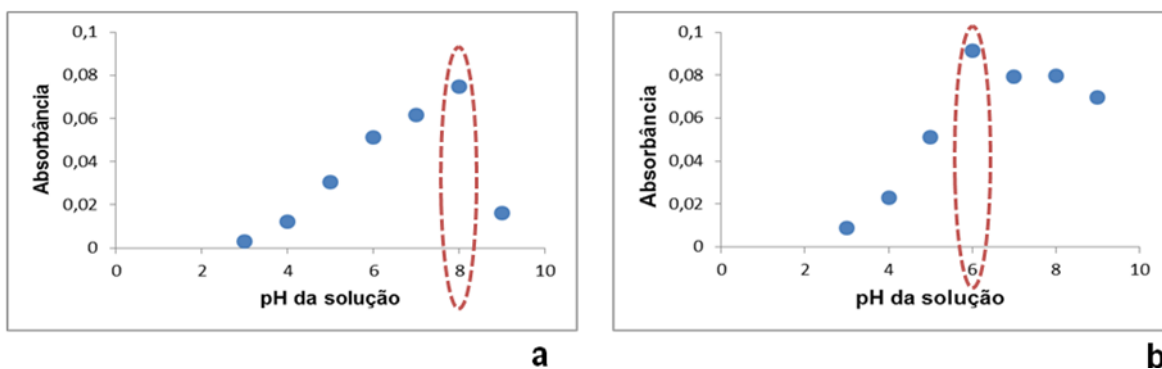


Figura 30. Sinais de absorvância de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd versus pH do meio para: a) método 1 de oxidação dos NTC e b) método 2 de oxidação dos NTC ( $n = 3$ )

Para o método de oxidação 1 (em que apenas  $\text{HNO}_3$  foi utilizado), o valor ideal de pH para melhor pré-concentração de Cd foi igual a 8, obtendo-se um sinal de absorvância 3 vezes superior ao de uma solução de concentração igual a que foi passada pela coluna ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd). Para o método 2 (no qual foi empregada uma mistura de  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ) o valor de pH mais adequado para a pré-concentração de Cd foi igual a 6 e o sinal de absorvância foi maior, sendo igual a 5 vezes em relação ao sinal de uma solução  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd.

Para Pb, os sinais de absorvância obtidos foram semelhantes aos sinais do *background*, indicando que não ocorreu uma pré-concentração eficiente, uma vez que somente a partir de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  consegue-se determinar Pb no sistema TS-FF-AAS otimizado.

Ainda que resultados promissores tenham sido obtidos para a determinação de Cd por TS-FF-AAS, empregando uma coluna de NTC funcionalizados em etapa de pré-concentração, decidiu-se por avaliar outro procedimento mais simples e rápido. A oxidação de nanotubos de carbono é amplamente utilizada quando objetiva-se aumentar a dispersão desses materiais em soluções aquosas e solventes polares, para que seja viável sua utilização. Entretanto, no contexto de uma etapa de pré-concentração *off-line* prévia à determinação por TS-FF-AAS, o ideal seria que a pré-concentração se desse de maneira mais rápida e simples. A funcionalização dos nanotubos de carbono é um procedimento demorado e moroso, envolvendo muitas etapas até a obtenção do material seco e pronto para preenchimento da coluna.

Desse modo, foi avaliado um procedimento com o objetivo de formar complexos de Pb e Cd com DDTP. Em seguida, a solução contendo os

possíveis complexos formados foi passada através de uma coluna ( $m = 20 \text{ mg}$ ) de NTC não oxidados.

Os agentes quelantes que contêm grupos fosfatados tais como O,O-dietilditiofosfato de amônio (DDTP) são uma alternativa interessante quando se objetiva a complexação de metais. Tal complexação ocorre em meio ácido (pH aproximadamente igual a 2 para o Cd e Pb), no qual o DDTP reage com vários metais de transição mas não reage com metais alcalinos, alcalinos terrosos, ferro e vários ânions geralmente abundantes em amostras de alimentos. Logo, a complexação com DDTP favorece a separação dos analitos de interesse dos interferentes da matriz (Tarley & Arruda, 2004; Fernandes *et al.*, 2001).

A avaliação dos parâmetros envolvidos na adsorção dos complexos à superfície foi realizada considerando-se uma solução  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cd e Pb, respectivamente.

O procedimento consistiu em adicionar a solução de DDTP àquela que continha os analitos, agitar em vórtex por 20 segundos e passar pela coluna preenchida com nanotubos não funcionalizados. Em seguida, foi realizada uma etapa de dessorção dos analitos com etanol  $80\% \text{ v v}^{-1}$ .

Inicialmente, avaliou-se a complexação de Cd com DDTP em função do pH do meio (1 a 9, ajustados com soluções de NaOH e HNO<sub>3</sub>). Para tal, a um volume de 10 mL de solução  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd e Pb, respectivamente, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de solução de DDTP  $0,1 \text{ \% m v}^{-1}$ . Essa solução foi passada através da coluna de nanotubos com uma vazão de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Em seguida, foi realizada uma etapa de dessorção dos analitos, passando-se através da coluna 1 mL de etanol  $80\% \text{ v v}^{-1}$ . Essa fração dessorvida foi levada ao TS-FF-AAS para determinação.

Para o Pb não foi alcançada uma pré-concentração eficiente em nenhum valor de pH. A Figura 28 apresenta os sinais de absorvância obtidos para Cd na fração dessorvida da coluna de nanotubos, para cada valor de pH avaliado.

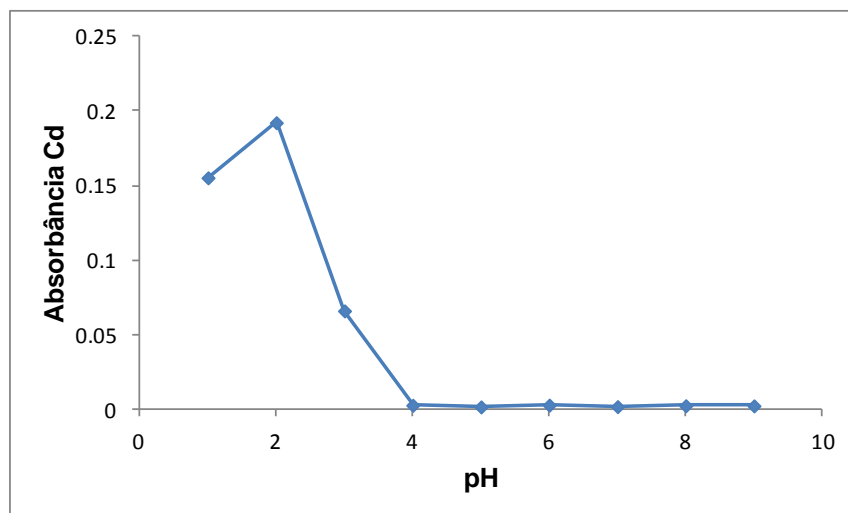


Figura 31. Sinais de absorbância obtidos na determinação de Cd nas frações dessorvidas em cada valor de pH.

Observa-se que o valor de pH que favorece a maior complexação de Cd com DDTP é 2. O mesmo comportamento foi observado por Tarley e Arruda em trabalho envolvendo a pré-concentração de complexos Cd-DDTP em espuma de poliuretano.

Inicialmente, foi realizado um teste no qual foi avaliada a adição de 3 volumes diferentes de DDTP (50, 100 e 200  $\mu\text{L}$ ) à 10 mL de solução de Cd 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Essas soluções foram passadas através da coluna preenchida com nanotubos e, em seguida, através da coluna 1 mL de etanol 80% v v<sup>-1</sup> para dessorção dos analitos. A TS-FF-AAS foi utilizada para determinar Cd nessas frações dessorvidas da coluna.

As melhores respostas foram obtidas para o volume de 50  $\mu\text{L}$  de DDTP, produzindo um sinal de absorbância 5 vezes superior ao sinal da solução 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd. Para verificar se a complexação estava acontecendo com máxima eficiência foram também avaliados 50  $\mu\text{L}$  de DDTP 0,3 e 0,5 % m v<sup>-1</sup> adicionados a 10 mL da solução 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd. A Tabela 26 apresenta os sinais de absorbância obtidos quando se utilizou cada uma das 3 concentrações de DDTP. Os maiores valores de absorbância foram obtidos para 50  $\mu\text{L}$  de DDTP 0,1 % m v<sup>-1</sup> e são praticamente iguais à absorbância obtida para 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd, havendo um ganho de aproximadamente 5 vezes no sinal analítico. A diminuição do sinal de absorbância com o aumento da

concentração de DDTP provavelmente ocorreu por causa da competição entre o DDTP e os complexos Cd-DDTP pelos sítios dos nanotubos de carbono.

Tabela 26. Sinais de absorvância de Cd das frações dessorvidas *versus* concentração de DDTP utilizada na complexação.

Concentração de DDTP (% m v <sup>-1</sup> )	Sinais de absorvância média
0,1	0,1363
0,3	0,1175
0,5	0,0736

Para obter o fator de pré-concentração teórico foram preparadas duas curvas de calibração de Cd (0, 2, 4, 6, 8 e 10 µg L<sup>-1</sup>) em HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Uma das curvas foi pré-concentrada segundo os parâmetros otimizados (pH=2; 50 µL de solução de DDTP 0,1 %m v<sup>-1</sup> e vazão de dessorção de 0,5 mL min<sup>-1</sup>). As duas curvas de calibração (com e sem passar por pré-concentração) foram determinadas por TS-FF-AAS.

Para a curva de calibração sem pré-concentrar obteve-se a seguinte equação de regressão:  $y = 0,0041x + 0,0025$  e para a curva que passou pela etapa de pré-concentração a equação de regressão obtida foi  $y = 0,0203x + 0,003$ . Desse modo, considerando a razão entre as inclinações das curvas foi obtido um fator de pré-concentração igual a 4,95. A Figura 29 apresenta as curvas de calibração mencionadas.

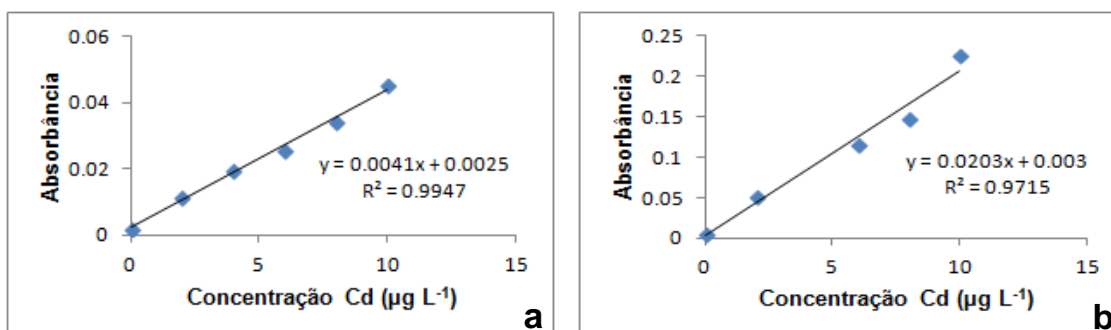


Figura 32. Em a: curva analítica de Cd não pré-concentrada e em b: curva analítica de Cd pré-concentrada.



As amostras de patês de atum, fígado, frango, peito de peru e presunto foram digeridas de acordo com o procedimento descrito no item 4.5 do capítulo 1. Em seguida, ajustou-se o pH desses digeridos para aproximadamente 2, com soluções de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{NaOH}$ . A um volume de 10 mL de cada um desses digeridos foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução de DDTP 0,1 %  $\text{m v}^{-1}$ , agitado em vórtex e passado através da coluna preenchida com aproximadamente 20 mg de nanotubos de carbono e posterior dessorção com etanol 80%  $\text{v v}^{-1}$ . A determinação de Cd nas frações dessorvidas com etanol foram realizadas por TS-FF-AAS. Os resultados obtidos foram inferiores ao limite de detecção fornecido pela técnica. Tal fato pode ser explicado pela concentração de Cd nas amostras nas quais não é promovida a formação de complexos Cd-DDTP em quantidade suficiente para que o analito seja determinado por TS-FF-AAS. Outra possibilidade para não detecção de Cd nas frações dessorvidas com etanol é a severa interferência dos constituintes da matriz, que são preferencialmente retidos em detrimento de possíveis complexos de Cd-DDTP formados.

Com o objetivo de avaliar a interferência dos constituintes da matriz na adsorção dos complexos de Cd na minicoluna preenchida com nanotubos, foram realizados experimentos de adição de Cd à amostra de patê de presunto, que foi submetida ao procedimento de decomposição descrito no item 4.5 do capítulo 1. Posteriormente, foi feito o ajuste de pH para 2, de modo que a concentração de Cd nos digeridos fosse igual a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para o qual obteve-se um sinal de absorvância adequado em estudos preliminares de adição de Cd aos digeridos. Para valores de concentração de Cd inferiores o sinal de absorvância obtido confundiu-se com o sinal de ruído instrumental.

Uma solução de concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd em  $\text{HNO}_3$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$ , adicionada de 50  $\mu\text{L}$  de DDTP 0,1 %  $\text{m v}^{-1}$  foi passada através da minicoluna preenchida de nanotubos. Para as frações dessorvidas com etanol 80%  $\text{v v}^{-1}$  foi obtido um sinal de absorvância igual a 0,6111.

Na Tabela 27 são mostrados os sinais de absorvância obtidos para a determinação de Cd nas frações dessorvidas da coluna, quando por ela foram passadas quintuplicatas de soluções de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd em meio aos digeridos de patê de presunto, com pH ajustado para aproximadamente 2. Nessa tabela

são mostrados dois conjuntos de quintuplicatas independentes, cada conjunto obtido usando uma coluna distinta de nanotubos.

Tabela 27. Sinais de absorvância obtidos na determinação de Cd nas frações dessorvidas da coluna de nanotubos após passagem de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd em meio aos digeridos de patê de presunto.

Conjunto 1 – $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em meio aos digeridos de patê de presunto		Conjunto 2 – $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em meio aos digeridos de patê de presunto	
Replicata	Absorvância	Replicata	Absorvância
1	0,0479	1	0,0543
2	0,0472	2	0,0532
3	0,0236	3	0,0254
4	0,0276	4	0,0248
5	0,0014	5	-0,0021

Como pode ser visto na Tabela 27, os sinais de absorvância obtidos não chegam a representar 10% do sinal de absorvância obtido para o mesmo valor de concentração de Cd preparado em  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , ou seja, sem a presença da matriz. Pode-se notar que em cada conjunto as replicatas 3 e 4 apresentam sinais de absorvância que são aproximadamente a metade dos sinais de absorvância obtidos para as duas primeiras replicatas, ou seja, à medida que a coluna foi sendo utilizada os interferentes ficaram aderidos à mesma, havendo competição dos mesmos com os complexos de Cd-DDTP. A partir da quinta replicata não foi possível obter sinal de absorvância para Cd que se diferenciasse do sinal do *background*.

Para se conhecer quais seriam os principais interferentes e justificar o decréscimo do sinal devido à matriz, foram preparadas soluções multielementares em  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , em três níveis de concentração de Fe, Zn e Cu, contendo  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd, uma vez que o agente complexante utilizado não reage com metais alcalinos e alcalinos terrosos como Na e Ca, presentes em concentrações apreciáveis na amostra de patê de presunto. O nível 2 de concentração foi preparado de modo a conter aproximadamente as concentrações de Fe e Zn determinadas no digerido de patê de presunto. Já

para o Cu a concentração considerada foi aquela determinada no digerido de patê de fígado. Os níveis 1 e 3 corresponderam à metade e ao dobro dessas concentrações, respectivamente. Cada nível foi preparado em triplicata e as soluções foram submetidas ao procedimento de pré-concentração. A Tabela 28 apresenta os valores de absorvância médios de Cd obtidos para as soluções preparadas em três níveis de concentração de interferentes (Cu, Fe e Zn).

Tabela 28. Valores de absorvância de 50 µg L<sup>-1</sup> de Cd na presença de Cu, Fe e Zn como interferentes.

Nível	Concentração da solução interferente (mg L <sup>-1</sup> )	Absorvância de Cd (n=3)	% Recuperação
1	Cu (0,40); Fe (0,25); Zn (0,80)	0,6257	102,4
2	Cu (0,80); Fe (0,50); Zn (1,6)	0,3934	64,40
3	Cu (1,6); Fe (1,0); Zn (3,2)	0,0334	5,500
	50 µg L <sup>-1</sup> de Cd	0,61111	-

Como evidenciado na Tabela 28, para o nível 1, que corresponde à metade das concentrações de Fe e Zn determinadas no patê de presunto e à metade da concentração de Cu determinada no patê de fígado, não há decréscimo de sinal de absorvância para 50 µg L<sup>-1</sup> de Cd, sendo que a porcentagem de recuperação do sinal de Cd foi de 102,4%. Entretanto, considerando a quantidade desses analitos que está presente nas amostras, há um decréscimo considerável de sinal para 50 µg L<sup>-1</sup> de Cd, obtendo-se 64,4% de recuperação em relação ao sinal de 50 µg L<sup>-1</sup> de Cd (0,61111). Pode-se inferir que os interferentes foram preferencialmente adsorvidos na coluna em detrimento do Cd. O decréscimo de sinal de Cd será tanto mais evidente quanto maior a concentração de Cu, Fe e Zn, sendo que para o nível 3 a porcentagem de recuperação foi de apenas 5,5%.

Diante do exposto acima é possível concluir que a utilização de nanotubos de carbono oxidados em laboratório não é uma alternativa viável quando a pretensão é promover a pré-concentração de Cd e determinação por TS-FF-AAS de amostras de patês. Como visto anteriormente, todo o procedimento de oxidação, lavagem e secagem dos nanotubos bem como o

preenchimento das minicolunas é moroso e o máximo fator de pré-concentração alcançado foi de 5 vezes.

Com relação à utilização dos nanotubos de carbono não oxidados, como preenchimento das minicolunas, que seriam responsáveis por adsorver os complexos Cd-DDTP, foi observada severa interferência de outros cátions como Cu, Fe e Zn presentes em maiores concentrações nas amostras de patês digeridas, os quais foram preferencialmente retidos na minicoluna.

## 12. CONCLUSÕES

A TS-FF-AAS representa um arranjo factível e barato para a determinação de elementos relativamente voláteis, principalmente Cd e Pb, em faixas de concentração de  $\mu\text{g L}^{-1}$  ou menores. A montagem do arranjo no espectrômetro de absorção atômica com chama sequencial torna a determinação menos morosa, uma vez que em espectrômetros com chama convencionais, faz-se necessária a utilização de injetores comutadores para levar um volume fixo de amostra e também a solução carregadora até o tubo atomizador.

Na etapa de otimização das condições experimentais da determinação sequencial de Cd e Pb por TS-FF-AAS, foi adotado um tubo atomizador de 10 furos na base, havendo um aumento da temperatura no interior do tubo, favorecendo a atomização dos analitos. Além disso, foi adotado um tempo igual a 70 segundos de *delay* de modo que haja tempo para que a solução da amostra chegue ao atomizador, e que o sinal de absorbância retorne a zero antes da próxima medida.

Quando não há a disponibilidade de equipamentos que permitam a determinação de concentrações tão baixas, como o espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite, a TS-FF-AAS apresenta-se como arranjo alternativo, acomodado ao espectrômetro de absorção atômica com chama, para a determinação de elementos tais como Cd e Pb, com significativa redução dos limites de detecção e quantificação em relação à FAAS.

O método desenvolvido para a determinação sequencial de Cd e Pb utilizou como atomizador o tubo de Ni com 10 furos na base que permitiram

maior entrada da chama no interior do mesmo, obtendo-se maiores valores de absorvância para as soluções padrão analisadas. Foi assumido um tempo de *delay* de 70 segundos, que foi o tempo mínimo em que houve garantia de inexistência de efeito de memória quando soluções concentradas de Pb foram aspiradas. O método apresentou adequada precisão, entretanto a veracidade deve ser melhor avaliada por meio de emprego de materiais de referência certificados, os quais possam ser decompostos através do programa de aquecimento adotado no método desenvolvido no capítulo 1, sem que haja uma excessiva diluição que impossibilite a análise por TS-FF-AAS.

Os procedimentos de pré-concentração avaliados não foram considerados eficientes. Outros procedimentos tais como extração em ponto nuvem ou adsorção de complexos dos analitos em outros materiais tais como espumas de poliuretano ou em colunas C18 devem ser avaliados para a pré-concentração simultânea e determinação sequencial de Cd e Pb.

### 13. REFERÊNCIAS

Abu-Samra, A.; Morris, J. S.; Koirtyohann, S. R.. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47 (1975) 1475-1477.

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Requisitos Gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, 2ª edição, ABNT, 2005.

Amorim, F. A. C.; Ferreira, S. L. C.. Determination of cadmium and lead in table salt by sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 65 (2005) 960-964.

Amorim, F. A. C.; Lobo, I. P.; Santos, V. L. C. S.; Ferreira, S. L. C.. Espectrometria de Absorção Atômica: o caminho para determinações multi-elementares. *Química Nova*, 31 (2008) 1784-1790.

ANVISA. Decreto 55.871, 26 de março de 1965. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/414d248047458a7d93f3d73fbc4c6735/DECRETO+N%C2%BA+55.871,+DE+26+DE+MAR%C3%87O+DE+1965.pdf?MOD=AJPERES>.

Anwar, J.; Shafique, U.; Waheed-uz-Zaman; Rehman, R.; Salman, M.; Dar, A.; Anzano, J. M.; Ashraf, U.; Ashraf, S.. Microwave chemistry: Effect of ions on dielectric heating in microwave ovens. *Arabian Journal of Chemistry*, (2011).

Araújo, G. C. L.; Gonzalez, M. H.; Ferreira, A. G.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A.. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Part B*, 57 (2002) 2121-2132.

Araujo, P.. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 2224–2234.

Avilés, F.; Cauich-Rodríguez, J. V.; Moo-Tah, L.; May-Pat, A.; Vargas-Coronado, R.. Evaluation of mild acid oxidation treatments for MWCNT functionalization. *Carbon*, 47 (2009) 2970-2975.

Bader, N. R.; Zimmermann, B.. Sample preparation for atomic spectroscopic analysis: an overview. *Advances in Applied Science Research*, 3 (2012) 1733-1737.

Baird, C. *Química Analítica Ambiental*. 2ª Edição. Editora Bookman, Porto Alegre, 2002.

Bings, N. H.; Bogaerts, A.; Broekaert, J. A. C.. Atomic Spectroscopy: A review. *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 4653-4681.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.. *Como fazer experimentos*. 3ª Edição. Editora Unicamp, Campinas, 2007.

Bizzi, C. A.; Flores, E. M. M.; Picoloto, R. S.; Barin, J. S.; Nóbrega, J. A.. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. *Analytical Methods*, 2 (2010) 734 – 738.

Bressani, F. A.; Silva, H. O.; Nóbrega, J. A.; Costa, L. M.; Nogueira, A. R.A.. Digestão de óleo lubrificante encapsulado em forno de microondas com radiação focalizada por adição de amostra ao reagente pré-aquecido. *Química Nova*, 29 (2006) 1210-1214.

Castro, J. T.; Santos, E. C.; Santos, W. P. C.; Costa, L. M.; Korn, M.; Nóbrega, J. A.; Korn, M. G.. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, 78 (2009) 1378-1382.

Charnet, R.; Freire, C. A. L.; Charnet, E. M. R.; Bonvino, H.. *Análise de modelos de regressão linear*. 2ª Edição. Editora Unicamp, Campinas, SP, 2008.

Chen, S.; Liu, C.; Yang, M.; Lu, D.; Zhu, L.; Wang, Z.. Solid-phase extraction of Cu, Co and Pb on oxidized single-walled carbon nanotubes and their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, 170 (2009) 247-251.

Chiang, Y.; Lin, W.; Chang, Y.. The influence of treatment duration on multi-walled carbon nanotubes functionalized by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub> oxidation. *Applied Surface Science*, 257 (2011) 2401-2410.

Christos, T. C.; Loutsidou, A. C.; Spiliopoulou, C. A.; Stefanidou, M. E.. Zinc and human health: an update. *Archives of Toxicology*, 86 (2011) 521 – 534.

Cozzolino, S. M. F.. Biodisponibilidade de nutrientes. 3ª Edição, Editora Manole, Barueri, 2005.

Daguer, H.; Silva, H. D.; Higashiyama, E. T.; Zanette, C. M.; Bersot, L. S.. Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no estado do Paraná. *Ciência Animal Brasileira*, 12 (2011) 359-364.

Davies, J.; Berndt. H.. Improvements in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 479 (2003) 215-223.  
Demirel, S. ; Tuzen, M. ; Saracoglu, S. ; Soylac, M.. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. *Journal of Hazardous Materials*, 152 (2008) 1020-1026.

Demirezen, D.; Uruç, K.. Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. *Meat Science*, 74 (2006) 255-260.

Dionísio, A. G. G.; Jesus, A. M. D.; Amais, R. S.; Donati, G. L.; Miranda, K. A.; Guerra, M. B. B.; Nóbrega, J. A.; Pereira-Filho, E. R.. Old and new flavors of flame (furnace) atomic absorption spectrometry. *International Journal of Spectroscopy*, 2011 (2011) 1-30.

Fernandes, A. P.; Moraes, M.; Gomes Neto, J. A.. Potencialidades e aplicações do ligante dietilditiofosfato de amônio em análises químicas. *Eclética Química*, 26 (2001) 213-224.

Fortuny, M.; Ramos, A. L. D.; Dariva, C., Egues, S. M. S.; Santos, A.F.; Nele; M.; Coutinho, R.C.C.. Principais aplicações das microondas na produção e refino de petróleo. *Química Nova*, 31 (2008) 1553 - 1561.

Fuwa, K.; Valee, B. L.. The Physical of analytical atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*, 35 (1963) 942-946.

Gáspár, A.; Berndt, H.. Beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry: A new flame method. *Analytical Chemistry*, 72 (2000a) 240-246.

Gáspár, A.; Berndt, H.. Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) – a simple method for trace element determination with microsamples in the  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentration range. *Spectrochimica Acta Part B*, 55 (2000b) 587-597.



Gáspár, A.; Szélez, E.; Berndt, H.. Analysis of submicroliter samples using micro thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (2002) 136-140.

Gonzalez, M. H.; Souza, G. B.; Oliveira, R. V.; Forato, L. A.; Nóbrega, J. A.; Nogueira, A. R. A.. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: identification of reaction products. *Talanta*, 79 (2009) 396-401.

Al-Harashsheh M.; Kingman S.W.. Microwave-assisted leaching – a review. *Hydrometallurgy*, 73 (2004) 189-203.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, revisão 1, Rio de Janeiro, 2003.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, revisão 4, Rio de Janeiro, 2011.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Vocabulário Internacional de Metrologia - Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Edição Luso-Brasileira, Rio de Janeiro, 2012.

Ivanova, E.; Berndt, H.; Pulvermacher, E.. Air driven on-line separation and preconcentration on a C18 column coupled with thermospray flame furnace AAS for the determination of cadmium and lead at  $\mu\text{g L}^{-1}$  levels. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, 19 (2004) 1507-1509.

Jia, Z.; Wang, Z.; Liang, J.; Wei, B.; Wu, D.. Production of short multi-walled carbon nanotubes. *Carbon*, 37 (1999) 903-906.

Kingston, H. M.; Haswell, S. J. *Microwave Enhanced Chemistry*. American Chemical Society, Washington DC, EUA: 1997.

Korn, M. G. A.; Boa-Morte, E. S.; B. Santos, D. C. M.; Castro, J. T.; Barbosa, J. T. P.; Teixeira, A. P.; Fernandes, A. P.; Welz, B.; Santos, W. P. C.; Santos, E. B. G. N.; Korn, M.. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43 (2008) 67-92.

Krug, F. J.. Métodos de preparo de amostras-Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 2ª Edição. Piracicaba, 2010.

Lamble, K. J.; Hill, S. J.. Microwave digestion procedures for environmental matrices. *Critical Review. Analyst.* 123 (1998) 103R-133R.

Latorre, C. H.; Méndez, J. A.; García, J. B.; Martín, S. G.; Crecente, R. M. P.. Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review. *Analytica Chimica Acta*, 749 (2012) 16-35.

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) 107-113.

Lowe, R. M.; Sullivan, J. V.. Developments in light sources and detectors for atomic absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, 54 (1999) 2031-2039.

L'vov, B. V.. The analytical use of atomic absorption spectra. *Spectrochimica Acta Part B*, 17 (1961) 761-770.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica, 1ª edição, Brasília, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa, nº 21, 31 de Julho de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de patê. Disponível em: [http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/carnes\\_pate.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/carnes_pate.htm). Acessado em dezembro de 2013.

Massart, D. L.; Vandeginste, B. M. G.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J.. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. New York, EUA: 1997.

Matusiewicz, H.. Atom trapping and in situ preconcentration techniques for flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 52 (1997) 1711-1736.

Méndez, J. A.; García, J. B.; Crecente, R. M. P.; Martín, S. G.; Latorre, C. H.. A new flow injection preconcentration method based on multiwalled carbon nanotubes for the ETA-AAS determination of Cd in urine. *Talanta*, 85 (2011) 2361-2367.

MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. GMC/RES. nº 012/2011. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. LXXXIV GMC (Grupo Mercado Comum). Assunção, 17 de junho de 2011. Disponível em: [http://www.mercosur.int/innovaportal/v/3187/1/secretaria/resoluc%C3%B5es\\_2\\_011](http://www.mercosur.int/innovaportal/v/3187/1/secretaria/resoluc%C3%B5es_2_011). Acessado em: dezembro de 2013.

Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira, 2008. Disponível em [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira\\_2008.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2008.pdf). Acessado em novembro de 2013.

Miranda, K.; Dionísio, A. G. G.; Pereira-Filho, E.. Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization. *Microchemical Journal*, 96 (2010) 99-101.

Miranda, K. A.. Desenvolvimento de métodos analíticos empregando a espectrometria de absorção atômica sequencial rápida com atomização em chama. São Carlos, programa de pós-graduação em Química, UFSCar, 2012. Tese de doutorado.

Miranda, K. A.; Pereira-Filho, E. R.. Potentialities of thermospray fame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) in the fast sequential determination of Cd, Cu, Pb and Zn. *Analytical Methods*, 1 (2009) 215-219.

Murphy, C. J.; MacNeil, J. D.; Capar, S. G.. Best practices for single-laboratory validation of chemical methods for trace elements in foods. Part I – background and general considerations. *Journal of AOAC International*, 96 (2013) 190-203.

Nascentes, C. C.; Kamogawa, M. Y.; Fernandes, K. G.; Arruda, M. A. Z.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, A. J.. Direct determination of Cu, Mn, Pb and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 60 (2005) 749-753.

Neutzling, M. B.; Assunção, M. C. F.; Malcon, M. C.; Hallal, P. C.; Menezes, A. M. B.. Hábitos alimentares de escolares adolescentes de Pelotas, Brasil. *Revista de Nutrição*, 23 (2010) 379-388.

Nóbrega, J. A.; Pirola, C.; Fialho, L. L.; Rota, G.; Campos Jordão, C. E. K. M. A.; Pollo, F.. Microwave-assisted digestion of organic samples: how simple can it become? *Talanta*, 98 (2012) 272-276.

Okumura, F.; Cavalheiro, E. T. G.; Nóbrega, J. A.. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. *Química Nova*, 27 (2004) 832-836.

Oliveira, E.. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2003) 174-182.

Ozcan, S. G.; Satioglu, N.; Soylak, M.. Column solid phase extraction of iron (III), copper (II), manganese (II) and lead (II) ions food and water samples on multi-walled carbon nanotubes. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 2401-2406.

Parodi, B.; Savio, M.; Martinez, L. D.; Gil, R. A.; Smichowsli, P.. Study of carbon nanotubes and functionalized-carbon nanotubes as substrates for flow injection solid phase extraction associated to inductively coupled plasma with ultrasonic nebulization. Application to Cd monitoring in solid environmental samples. *Microchemical Journal*, 98 (2011) 225-230.

Pedro, N. A. R.; Fili, S. P.; Oliveira, E.. Determinação de nutrientes minerais em alguns produtos cárneos. *Brazilian Journal of Food Technology*. 3 (2000) 121-127.

Pereira, M. G.; Pereira-Filho, E. R.; Berndt, H.; Arruda, M. A. Z.. Determination of cadmium and lead at low levels by using preconcentration at fullerene coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 59 (2004) 515-521.

Pereira-Filho, E. R.; Berndt, H.; Arruda, M. A. Z.. Simultaneous sample digestion and determination of Cd, Cu and Pb in biological samples using thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) with slurry sample introduction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (2002) 1308-1315.

Petrucelli, G. A.; Stocco, P. K.; Bueno, M. I. M. S.; Pereira-Filho, E. R.. Tube atomizers in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry: characterization using x-ray fluorescence, scanning electron microscopy and chemometrics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (2006) 1298-1304.

Projahn, H. D.; Ute, S.; Sanders, J.; Vanclay, E.. Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004) 1083-1087.

Pyrzynska, K.. Carbon nanostructures for separation, preconcentration and speciation of metal ions. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 718-727.

Reilly, C. *Metal Contamination of Food: Its significance for food quality and human health*. Oxford: Blackwell Science, 2002.

RSC (Royal Society of Chemistry). *Analytical Methods Comitee Technical Brief: Is my calibration linear?* RSC, 2005, 1- 2.

Rubeska, I.. The determination of trace elements in sulphide minerals by atomic absorption spectrophotometry with absorption tubes. *Analytica Chimica Acta*, 40 (1968) 187-194.

Schifer, T. S.; Junior, S. B.; Montano, M. A. E.. Aspectos toxicológicos do chumbo. *Infarma*, 17 (2005) 67-72.

Silva, E. G. P.; Santos, A. C. N.; Costa, A. C. S.; Fortunato, D. M. N.; José, N. M.; Korn, M. G. A.; Santos, W. N. L.; Ferreira, S. L. C.. Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 82 (2006) 159 – 162.

Silva, I. R.; Barreto, P. L. M.; Belletini, I. C.. Estudo das dispersões aquosas de nanotubos de carbono utilizando diferentes surfactantes. *Química Nova*, 36 (2013) 5-9.

Slavin, W.. Atomic Absorption Spectroscopy: Why has it become successful? *Analytical Chemistry*, 63 (1991) 1033A-1038A.

Smith, F. E.; Arsenault, E. A.. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta*, 43 (1996) 1207-1268.

Sneddon, J.; Farah, B. D.; Farah, K.S.. Multielement atomic absorption spectrometry: a historical perspective. *Microchemical Journal*, 48 (1993) 318-325.

Souza-Filho, A. G.; Fagan, S. B.. Funcionalização de nanotubos de carbono. *Química Nova*, 30 (2007) 1695-1703.

Souza, S. N. P.; Costa, L. M.; Nascentes, C. C.. Validation of microwave-assisted digestion procedure of pâté samples using diluted HNO<sub>3</sub> for Fe and Zn determination by FS FAAS. *Analytical Methods*, 5 (2013) 6411-6415.

Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G.. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, 552 (2005) 25-35.

Souza, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte, programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos, UFMG, 2007. Tese de doutorado.

Stafiej, A.; Krystyna, P.. Adsorption of heavy metal ions with carbon nanotubes. *Separation and Purification Technology*, 58 (2007) 49-52.

Tarley, C. R. T.; Arruda, M. A. Z.. A sensitive method for cadmium determination using an on-line polyurethane foam preconcentration system and thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences*, 20 (2004) 961-966.

Tarley, C. R. T.; Arruda, M. A. Z.. Online coupling of a flow injection system to TS-FF-AAS for preconcentration and determination of lead in water and vegetables. *Analytical Letters*, 38 (2005) 1427-1443.

Tarley, C. R. T.; Barbosa, A. F.; Segatelli, M. G.; Figueiredo, E. C.; Luccas, P. O.. Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd (II) determination at ng L<sup>-1</sup> levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (2006) 1305-1313.

Taverniers, I.; De Loose, M.; Bockstaele, E. V.. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2004) 535 – 552.

Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 74 (2002) 835 – 855.

Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Fajgelj, A.; Willetts, P.; Wood, R.. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure and Applied Chemistry*, 71 (1999) 337-348.

Toloni, M. H. A.; Longo-Silva, G.; Goulart, R. M. M.; Taddei, J. A. A. C.. Introdução de alimentos industrializados e de alimentos de uso tradicional na dieta de crianças de creches públicas no município de São Paulo. *Revista de Nutrição*, 24 (2011) 61-70.

Trojanowicz, M.. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2006) 480-489.

Vahter, M.; Akesson, A.; Lidén, C.; Ceccatelli, S.; Berglund, M.. Gender difference in the deposition and toxicity of metals. *Environmental Research*, 104 (2007) 85-95.

Vandecasteele, C.; Block, C. B. .Modern Methods for Trace Element Determination. 1ª Edição, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1997.

Velásquez-Meléndez, G.; Martins, I. S.; Cervato, A. M.; Fornés, N. S.; Marucci, M. F. N.. Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 31 (1997) 157-162.

Vessman, J.; Stefan, R. I.; Staden, J. F. V.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D. T. ; Fajgelj, A.; Müller, H.. Selectivity in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 73 (2001) 1381-1386.

Vieira, D. R.; Castro, J. T.; Lemos, V. A.. Determination of lead and manganese in biological samples and sediment using slurry sampling and flame atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*, 94 (2011) 645-649.

Walsh, A.. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochimica Acta Part B*, 7 (1955)108-117.

Watling, R. J.. The use of a slotted quartz tube for the determination of arsenic, antimony, selenium and mercury. *Analytica Chimica Acta*, 94 (1977) 181-186.

Welz, B.; Sperling, M. Atomic Absorption Spectrometry. 3a. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

World Health Organization. Iron Deficiency Anaemia. Assessment, Prevention and Control. Disponível em: [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia\\_iron\\_deficiency/WHO\\_NHD\\_01.3/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/). Acessado em setembro de 2013.

Wu, P.; Zhang, Y.; Lv, Y.; Hou, X.. Cloud point extraction-thermospray flame quartz furnace atomic absorption spectrometry for determination of ultratrace cadmium in water and urine. *Spectrochimica Acta Part B*, 61(2006): 1310-1314.