

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

DAIANE CIOATO

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
CÁDMIO E CHUMBO EM ALHO**

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

DAIANE CIOATO

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
CÁDMIO E CHUMBO EM ALHO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico - QUI” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial.

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes
Orientador

Porto Alegre
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Lanagro/RS pela oportunidade de desenvolver este trabalho, e pelo fornecimento dos insumos e equipamentos necessários para a realização do projeto. Agradeço imensamente à Cida e à Rose, minhas colegas de trabalho no laboratório de Metais, Traços e Contaminantes, pela paciência e apoio em todas as etapas não apenas deste trabalho, mas também de toda a minha graduação.

Agradeço ao meu orientador, professor Diogo, pela paciente e atenta revisão deste trabalho, pelas discussões, ensinamentos, e pela constante preocupação em transmitir seus conhecimentos.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul por oportunizar formação de excelência e desenvolvimento pessoal. A todos os professores do Instituto de Química da UFRGS, agradeço pelas aulas inspiradoras que me deram a certeza de serei feliz na minha escolha profissional.

Agradeço à colega Edna Silvana de Oliveira, do Lanagro/Recife pelas análises complementares a este trabalho.

Agradeço à professora Magda Beretta pelas discussões e sugestões para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, Luiza e Celeste, agradeço pelo apoio constante, por terem me proporcionado condições e incentivo para alcançar minhas conquistas até aqui.

E por fim, agradeço especialmente à Cida, minha amiga, colega, chefe, inspiração. Serei infinitamente grata por ter me recebido no MTC de coração aberto e me transmitido o seu conhecimento com carinho e paciência. Sem o teu incentivo eu não teria chegado até aqui. E por sempre continuar sonhando comigo em alcançar novos horizontes. Palavras não serão suficientes para mostrar minha gratidão.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

Cádmio e chumbo são contaminantes tóxicos que se acumulam no ambiente e em seres vivos, e são classificados como agente carcinogênico e possivelmente carcinogênico, respectivamente. O monitoramento da concentração destes contaminantes em produtos destinados à alimentação humana é essencial para a preservação da segurança química dos alimentos consumidos no Brasil. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina os limites de cádmio e chumbo em alho como $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O presente trabalho visa validar uma metodologia para a análise de cádmio e chumbo em alho. Foi empregada a técnica analítica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, aplicando procedimento de decomposição por via úmida em sistema aberto. Foram determinadas as seguintes figuras de mérito requeridas para a validação do método: recuperação, seletividade e efeito de matriz, parâmetros avaliados em dois níveis de concentração. Também foram determinados os limites de detecção e quantificação. Recuperações médias entre 90,1% e 100,5% foram obtidas. O método mostrou-se seletivo e foi evidenciada a ausência do efeito de matriz, indicando que o método é adequado ao uso. O limite de quantificação de cádmio foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o de chumbo foi de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ enquanto que os limites de detecção foram $0,15 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1,36 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método foi utilizado para a análise de 10 amostras de alho comercializadas no Rio Grande do Sul e em todas as amostras os valores para chumbo foram inferiores ao limite quantificação. Quanto ao cádmio, foi possível quantificar o analito em 5 amostras. Todas as amostras apresentaram concentração inferior aos limites máximos para Cd e Pb permitidos pela ANVISA. O método validado foi comparado com metodologia oficial estabelecida pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), apresentando resultados que apontam que as metodologias produzem resultados equivalentes para ambos os analitos. Foi realizado um estudo comparativo de custos de análise e implantação da metodologia validada e de referência, sendo que a metodologia empregada na validação se mostrou economicamente mais adequada.

Palavras-chave: Cádmio. Chumbo. Alho (*Alium sativum*). Contaminantes inorgânicos. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Validação de metodologia analítica.

ABSTRACT

Cadmium and lead are toxic contaminants that accumulate in the environment and in living beings, and they are classified as a carcinogenic and possibly carcinogenic agent, respectively. Monitoring the concentration of these contaminants in products intended for human consumption is essential for the preservation of the chemical safety of foods consumed in Brazil. The National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) determines the limits of cadmium and lead in garlic as $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The present work aims to validate a methodology for the analysis of cadmium and lead in garlic. Graphite furnace atomic absorption spectrometry was applied, using wet decomposition procedure in an open system. The following analytical figures of merit were required for the validation of the method: recovery, selectivity and matrix effect, parameters evaluated at two levels of concentration. Limits of detection and quantification were also determined. Mean recoveries between 90.1% and 100.5% were obtained. The method was selective and the absence of the matrix effect was evidenced, indicating that the method is suitable for use. The limit of quantification of cadmium was $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ and that of lead was $40 \mu\text{g kg}^{-1}$. The detection limits were $0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $1.36 \mu\text{g kg}^{-1}$ for Cd and Pb, respectively. The method was used for the analysis of 10 samples of garlic commercialized in Rio Grande do Sul, and in all cases the lead values were lower than limit of quantification. As for cadmium, it was possible to quantify the analyte in 5 samples. All the samples presented concentration below the maximum limits allowed by ANVISA for lead and cadmium. The validated method was compared with official methodology established by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), presenting results indicating that the methodologies produce equivalent results for both analytes. A comparative study of costs of analysis and implementation of the validated and reference methodology was carried out, and the methodology used in the validation was shown to be more economically appropriate.

Keywords: Cadmium. Lead. Garlic (*Alium sativum*). Inorganic contaminants. Graphite furnace atomic absorption spectrometry. Validation of analytical method.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores máximos de contaminantes permitidos em alho, estabelecidos pela ANVISA e pelo Codex Alimentarius.	13
Tabela 2 – Programa de temperatura, tempo e vazão de gás do forno de grafite para determinação de Cd e Pb.	23
Tabela 3 – TMC e níveis de fortificação da matriz branca.	26
Tabela 4 – Intervalo de aceitação da recuperação.	27
Tabela 5 – Recuperações médias empregando o MET/MTC/003/011, com alteração de massa de amostra e temperatura de decomposição (Condição A) e alterando também a diluição das amostras (Condição B).	29
Tabela 6 – Recuperação dos analitos adicionados à matriz branca.	31
Tabela 7 – Resultados dos cálculos de desvios padrão relativos predito e teórico, resultados experimentais, critérios de aprovação e resultados para avaliação da repetitividade.	32
Tabela 8 – Resultados das médias de concentração obtidas para as amostras não matrizadas e amostras brancas fortificadas (amostras matrizadas). Diferenças das médias e resultado do estudo do efeito de matriz.	33
Tabela 9 – Equação da reta da curva analítica e respectivo coeficiente de determinação (r), desvio padrão de 21 leituras da amostra branca (σ), e limite de detecção calculado para cada analito.	34
Tabela 10 – Descrição das amostras analisadas.	35
Tabela 11 – Concentrações de Cd e Pb nas amostras analisadas.	36
Tabela 12 – Resultados comparativos do teor de cádmio e chumbo pelo método de referência e pelo método proposto.	37
Tabela 13 – Custo dos insumos utilizados nas análises e para descarte dos resíduos gerados.	38
Tabela 14 – Quantidade e custo de cada insumo utilizado na análise.	39
Tabela 15 – Custo de implantação das diferentes metodologias analíticas.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês, *Atomic Absorption Spectrometry*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C – Concentração

CVG-AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Geração Química de Vapor (do inglês, *Chemical Vapour Generation Atomic Absorption Spectrometry*)

DPR_r – desvio padrão relativo

EDL – Lâmpada de Descarga sem Eletrodo (do inglês, *Electrodeless Discharge Lamp*)

ET AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (do inglês, *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*)

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*)

GF AAS – Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)

HG AAS – Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos (do inglês, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*)

HR CS AAS – Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (do inglês, *High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*)

HR ICP-MS – Espectrometria de Massa de Alta Resolução com fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)

ICP-MS – Espectrometria de Massa com fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP-OES – Espectrometria de Emissão Óptica com fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

IN – Instrução Normativa

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO – Organização Internacional para Padronização (do inglês, *International Standardization Organization*)

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

HCL – Lâmpada de Cátodo Oco (do inglês, *Hollow Cathode Lamp*)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIP-OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (do inglês, *Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry*)

m/z – Razão entre a massa e a carga de um íon

PDPR_r – Desvio Padrão Relativo Predito

DPR_{Horwitz} – Desvio Padrão Relativo Teórico

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

r – Coeficiente de Correlação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

TMC – Teor Máximo de Contaminante

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. CONTAMINANTES INORGÂNICOS	10
1.1.1. Cádmio	10
1.1.2. Chumbo	11
1.2. ALHO E CONTAMINAÇÃO	11
1.3. MATRIZ E ABSORÇÃO NA PLANTA	14
1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS	15
1.4.1. Espectrometria de emissão óptica e espectrometria de massa com fonte de plasma	15
1.4.2. Espectrometria de absorção atômica	16
1.5. PREPARO DE AMOSTRAS	18
1.6. VALIDAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	19
2. OBJETIVO	21
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. PROPOSTA TECNOLÓGICA	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. MATERIAIS E REAGENTES	22
4.2. LIMPEZA DO MATERIAL	22
4.3. EQUIPAMENTOS	22
4.4. AMOSTRAS	24
4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS	24
4.5.1. Método proposto	24
4.5.2. Método de referência	25
4.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	25
4.6.1. Recuperação	26
4.6.2. Repetitividade	27
4.6.3. Seletividade e efeito de matriz	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	29
5.2. PARÂMETROS DE MÉRITO	30
5.2.1. Recuperação	30
5.2.2. Repetitividade	32
5.2.3. Seletividade e efeito de matriz	33
5.2.4. Equação linear e limite de detecção	33
5.3. AMOSTRAS ANALISADAS	34
5.3.1. Método proposto	34
5.3.2. Comparação com método de referência	37
6. ESTIMATIVA DO CUSTO DA ANÁLISE	38
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTAMINANTES INORGÂNICOS

Os contaminantes inorgânicos constituem uma importante fonte de poluição ambiental. Cádmio, chumbo, mercúrio e arsênio são os principais elementos químicos, aos quais a exposição representa uma ameaça à saúde humana. Por este motivo, seus efeitos têm sido extensivamente estudados (JÄRUP, 2003). Apesar dos efeitos adversos à saúde, o uso e exposição a esses elementos são comuns, pois eles são utilizados em diversas aplicações. Cádmio e chumbo, por exemplo, são empregados em baterias recarregáveis. O cádmio é utilizado em pigmentos e tintas, bem como em ligas metálicas como agente inibidor de corrosão (ICDA, 2018; JÄRUP, 2003). Também está presente como contaminante em fertilizantes fosfatados (SMOLDERS; MERTENS, 2012). O chumbo é emitido à atmosfera durante o processamento de minério e durante a queima de combustíveis contendo o tetraetilchumbo, ainda utilizado em alguns combustíveis de aviação (USA, 2018). Frequentemente os resíduos de produtos contendo estes metais são dispostos inadequadamente junto ao lixo doméstico, contaminando solo e água. Quando há incineração destes resíduos ocorre a contaminação do ar. A exposição do homem aos elementos contaminados se dá através do contato com a pele, inalação ou ingestão de produtos contaminados (JÄRUP, 2003).

1.1.1. Cádmio

Cádmio ocorre naturalmente em minérios associado ao zinco, chumbo e cobre, e também é emitido em erupções vulcânicas (ICDA, 2018). Não é comprovada nenhuma função fisiológica deste metal no corpo humano (GODT et al., 2006). É um metal pesado que oferece severos riscos à saúde humana, o que justifica o interesse analítico. Entre as consequências da intoxicação por cádmio estão os danos aos rins, ossos e pulmões, e aumento do risco de câncer. Na população não fumante, os alimentos são a fonte mais importante de contaminação humana por cádmio, embora a exposição ambiental e ocupacional também seja relevante. Entre os fumantes, a concentração de cádmio no sangue é cerca de 4 a 5 vezes maior (JÄRUP et al., 1998), uma vez que o cádmio é rapidamente absorvido pelos pulmões (EFSA, 2012). A capacidade de combinação com outros elementos, bem como as numerosas aplicações industriais, favorecem a contaminação ambiental (ITALY, 2009).

A absorção de cádmio em seres humanos após a ingestão é estimada em 5%, mas sua retenção e persistência nos rins é eficiente, sendo estimada a meia-vida biológica de 30 anos (SATARUG; MOORE, 2004). A exposição a longo prazo pode causar osteomalácia

(amolecimento dos ossos) e osteoporose (ossos tornam-se frágeis e porosos). A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica o cádmio como carcinogênico (Grupo I), aumentando o risco de câncer de pulmão, endométrio, bexiga, próstata, rim e mama (ITALY, 2009, JÄRUP, 2003, FRANCE, 2012). A exposição prolongada também afeta o sistema nervoso central e o sistema reprodutivo (EFSA, 2012).

1.1.2. Chumbo

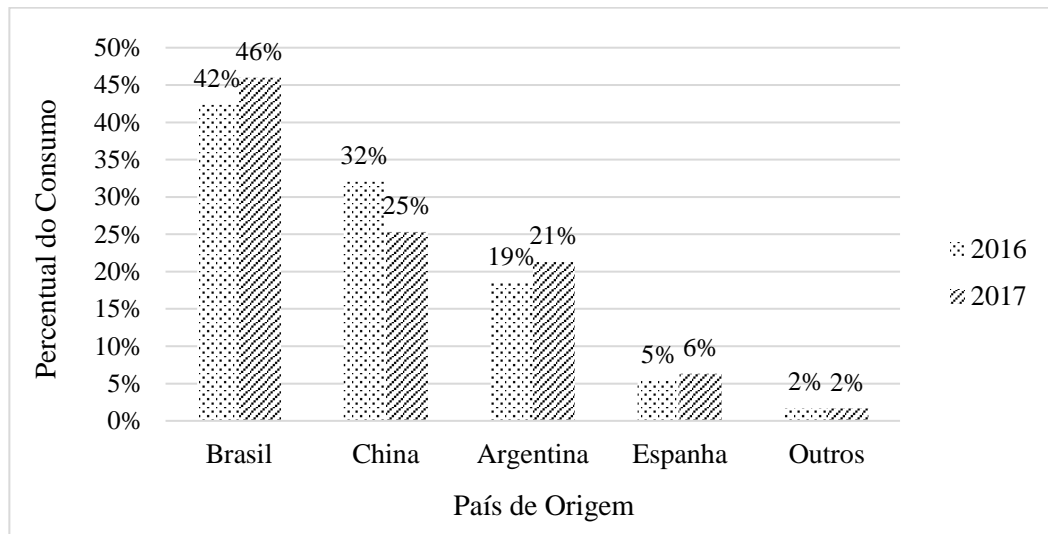
O chumbo há milhares de anos é usado pelo homem nas mais diversas aplicações. No império romano o chumbo era utilizado em tubulações e em recipientes para preparar e armazenar alimentos. O acetato de chumbo era utilizado para adoçar vinho. No último século a queima de combustíveis fósseis foi uma importante fonte de emissão do metal à atmosfera. Nas últimas décadas houve a redução deste tipo de contaminação devido à introdução de combustíveis isentos de chumbo. No entanto ainda há emissões deste metal em operações de mineração e fundições, e indústrias de baterias e vidro (JÄRUP, 2003).

A absorção do chumbo inalado chega a até 50% pelos pulmões. Quando ingerido é cerca de 10 a 15% absorvido em adultos, e cerca de 50% em crianças. A absorção ocorre no trato gastrointestinal, e a eliminação é lenta. O chumbo acumula-se nos ossos, e a sua meia-vida é de 20 a 30 anos. Na corrente sanguínea a meia-vida é de cerca de 1 mês (JÄRUP, 2003). A exposição a longo prazo pode causar danos ao sistema nervoso. Os principais sintomas da contaminação são dores de cabeça, irritabilidade, dor abdominal, insônia, sensibilidade dérmica, distúrbios comportamentais, dificuldades de aprendizado e concentração. Em casos severos ou de exposição prolongada podem ocorrer danos renais, anemia, aumento da pressão sanguínea, danos ao sistema neurológico e reprodutivo (EFSA, 2012). Em crianças pode causar diminuição da capacidade intelectual. A IARC classifica o chumbo como possível agente carcinogênico (Grupo 2A) (FRANCE, 2006).

1.2. ALHO E CONTAMINAÇÃO

O consumo de alho (*Allium sativum*) “per capita” no Brasil é de cerca de 1,50 kg por habitante ao ano (LUCINI, 2017). Nos últimos anos o Brasil produziu em torno de 45% do alho consumido no país e importou o restante. Os principais países exportadores de alho para o mercado brasileiro foram China, Argentina e Espanha. Entre outros países que exportaram o produto para o Brasil estão: Chile, Taiwan, Peru, Jordânia, Portugal, México, Uruguai, Egito, e Vietnã (LUCINI, 2017, BRASÍLIA, 2018).

Figura 1 – Alho consumido no Brasil nos anos de 2016 e 2017: país de origem do produto e percentual do consumo referente a cada origem.



Fonte: adaptado de Lucini (2017).

Observa-se na Figura 1 que nos últimos anos pelo menos um quarto do alho consumido no Brasil foi importado da China. Isto gera suspeitas com relação à qualidade do produto devido aos problemas de contaminação do solo na China, divulgados pelo próprio governo chinês com grande preocupação em 2014 (CHINA, 2014). O relatório aponta que 16% do solo, e 19,4% das áreas agrícolas analisadas foram classificadas como poluídas (QU et al., 2016). Os contaminantes inorgânicos que apresentam contaminação acima dos padrões foram: cádmio (em 7,0% das áreas analisadas), níquel (4,8%) arsênio (2,7%), cobre (2,1%), mercúrio (1,6%) chumbo (1,5%), cromo (1,1%) e zinco (0,9%) (CHINA, 2014).

Após a divulgação destes resultados alarmantes, o governo chinês lançou um plano de ação visando adoção de medidas para enfrentar o problema da poluição do solo (STANWAY, 2014). No entanto, algumas dificuldades são encontradas. Quatro fatores foram apontados como causas dominantes da grave contaminação: a aplicação pesada de insumos agrícolas, estilos de plantação antigos com pouca consciência da proteção ambiental, regulações e padrões antiquados e gerenciamento e supervisão ineficaz (HU et al., 2017). A falta de investimento financeiro também foi apontada como barreira (HU; JIN; KAVAN, 2014).

Por outro lado, muitos estudos vêm sendo conduzidos para mitigar os danos ambientais. Entre as áreas de estudo estão a utilização de plantas bioacumuladoras (fitoremediação), micro-organismos (biorremediação), compostos orgânicos quelantes, (LUO; TU, 2018), polímeros absorventes (LI et al., 2016) e técnicas combinadas (ALLOWAY, 2012)

para retirar contaminantes inorgânicos do solo. No entanto, muito progresso deve ser feito até que as soluções se difundam e a qualidade do solo atinja níveis seguros.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável por monitorar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional, através do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes na Área Vegetal (PNCRC/Vegetal). Existe, ainda, um subprograma de Produtos Importados, que tem por objetivo verificar se a segurança e qualidade destes produtos são semelhantes aos produtos nacionais. No entanto, atualmente o PNCRC/Vegetal realiza análises de monitoramento de amostras de alho nacionais e importadas apenas quanto à presença de agrotóxicos (BRASIL, 2017). As análises são realizadas pelos Laboratórios Nacionais Agropecuários (Lanagros), que são os laboratórios oficiais do MAPA, ou por laboratórios públicos e privados credenciados (BRASIL, 2018).

No Brasil, o teor máximo de contaminantes (TMC) inorgânicos em Hortaliças e Frutos com Folhas em Bainha, categoria à qual se inclui o alho, foi estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013). Os limites foram estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 42 de 29 de agosto de 2013 e constam na Tabela 1. Na mesma tabela constam os limites estabelecidos pelo Codex Alimentarius no CODEX-STAN 193 de 1995 (FAO, 1995; FAO, 2017). Cabe ressaltar que a RDC Nº 42 da ANVISA contempla o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos, um acordo entre os países participantes do MERCOSUL que estabeleceu os níveis máximos de contaminantes inorgânicos permitidos em alimentos, harmonizando a regulamentação técnica entre estes países. Assim, esta resolução é válida em todo o MERCOSUL.

Tabela 1 – Teores máximos de contaminantes permitidos em alho, estabelecidos pela ANVISA e pelo Codex Alimentarius.

Analito	TMC ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ANVISA ^a	TMC ($\mu\text{g kg}^{-1}$) CODEX ^b
Arsênio	100	Não estabelecido
Cádmio	50	50
Chumbo	100	100

Fonte: a - ANVISA, 2013; b - FAO, 1995

1.3. MATRIZ E ABSORÇÃO NA PLANTA

O alho é uma matriz de origem vegetal. A planta é composta pelas raízes, bulbo e folhas. Em estudos relacionados a produtos destinados à alimentação, a fração de maior interesse é a parte comestível da planta, ou seja, os bulbos. Quando fresco, apresenta em torno de 60% de umidade, baixa quantidade de lipídeos e calorias, e grande quantidade de carboidratos, fibras e micronutrientes, como o selênio (PURANIK et al., 2012).

O alho é conhecido popularmente como detentor de poderes curativos para diversas doenças como diabetes e hipertensão, além de apresentar propriedades antioxidantes (NWOKOCHA et al., 2012). A presença de compostos de enxofre é reportada como contribuinte para propriedades quelantes, assim como em outras drogas utilizadas para esta finalidade. Os compostos sulfurados também são precursores da glutathione, um importante antioxidante capaz de auxiliar na desintoxicação por metais pesados (TANDON; SINGH; PRASAD, 2001). Graças a estas propriedades, o alho tem demonstrado oferecer proteção contra contaminação com Cd em ratos, atenuando os danos ao fígado (CHA, 1987, OBIOHA et al., 2008), além de proteção, em menor grau, contra chumbo (NWOKOCHA et al., 2012).

Diversos estudos buscaram avaliar a capacidade de absorção de Cd e Pb por alho cultivadas sob condições simulando contaminação do solo e água com estes metais. Um estudo (JIANG; LIU; HOU, 2000) avaliou a absorção de Cd por alho cultivado em sistema hidropônico, submetendo a planta à irrigação com solução de cultivo contendo concentrações de 10^{-2} a 10^{-6} mol L⁻¹ de Cd⁺². Observou-se que a absorção ocorreu principalmente pelas raízes, que continham 70 a 90% da concentração total de Cd presente na planta. No bulbo foram detectados de 2 a 18% do total de Cd, enquanto nas folhas o analito estava presente na faixa de 0,6 a 7%. Resultados similares foram reportados para alho cultivado em condições análogas sob concentração de chumbo (Pb⁺²) de 10^{-3} a 10^{-5} mol L⁻¹ (LIU et al., 2008). Outro grupo (BAKSHAYESH; DELKASH; SCHOLZ, 2014) realizou um estudo cultivando alho, entre outros alimentos, sob condições que simularam a contaminação do próprio solo, através da adição de nitrato de cádmio em pó à terra de plantio. As concentrações do contaminante no solo foram de 0 a 120 mg kg⁻¹. Demonstrou-se que o cultivo de vegetais em solos contendo concentração de cádmio superior a 30 mg kg⁻¹ levou à produção de plantas cujos teores do contaminante excederam os limites máximos permitidos para o analito em alho (FAO, 1995). Em todos os estudos a concentração nas plantas foi proporcional à concentração de exposição e observou-se presença dos contaminantes na parte comestível da planta.

1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Existem diversas técnicas analíticas que possibilitam a determinação de elementos químicos. A concentração em que os analitos se encontram, número de analitos a serem determinados, além de disponibilidade e custo de equipamentos e reagentes serão determinantes na escolha da técnica analítica. Para análises de elementos traço, em que normalmente os analitos se encontram em concentrações de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$ as técnicas mais difundidas são a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), ambas técnicas multielementares, além da espectrometria de absorção atômica (AAS), técnica monoelementar. Estas três técnicas estão difundidas e bem estabelecidas em laboratórios de todo o mundo, e são empregadas para as mais diversas finalidades, dentre elas: pesquisas na área ambiental, petroquímica, siderúrgica, estudos no campo da saúde, farmacologia, entre muitas outras. A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-OES) é uma técnica multielementar que vem ganhando importância na última década, principalmente, pelo menor custo de operação.

1.4.1. Espectrometria de emissão óptica e espectrometria de massa com fonte de plasma

Na ICP-OES a amostra é introduzida em uma fonte de alta energia, que consiste de um plasma de argônio. A energia do plasma é absorvida pelos elementos, que então são termicamente excitados e sofrem transições eletrônicas, emitindo radiação em seus comprimentos de onda específicos. Este feixe de radiação passa por um elemento de difração que separa o feixe emitido em seus constituintes individuais. No espectrômetro esta radiação é medida e comparada aos padrões de calibração, sendo então quantificada. Com esta técnica analítica é possível detectar concentrações tão baixas quanto partes por bilhão (ppb ou $\mu\text{g L}^{-1}$).

A MIP-OES tem princípio de funcionamento muito similar. A fonte difere pelo sistema de geração e pelo gás do plasma. Energia de micro-ondas é utilizada para formar um plasma de nitrogênio. A amostra é introduzida no plasma através de um aerossol, e a radiação emitida é direcionada ao monocromador e então ao detector. Os limites de detecção típicos desta técnica são da ordem de partes por milhão (ppm ou mg L^{-1}) a partes por bilhão (ppb ou $\mu\text{g L}^{-1}$), dependendo do analito.

Já na técnica ICP-MS os íons produzidos no plasma de argônio são enviados a um espectrômetro de massa, que separa os íons com base na razão massa/carga, e o sistema de

detecção os quantifica. Os limites de detecção alcançados através desta técnica chegam a partes por trilhão (ppt ou ng L^{-1}).

Estas técnicas são multielementares, ou seja, permitem a análise de dezenas de analitos. Outras vantagens são a ampla faixa linear de trabalho, que usualmente compreende várias ordens de magnitude de concentração, alta sensibilidade, e, especialmente para a ICP-MS, o baixo ruído. Algumas limitações, no entanto, são significativas. Na ICP-OES os espectros de emissão podem ser bastante complexos, e pode ocorrer a sobreposição de comprimentos de ondas de diferentes elementos. Na ICP-MS há dois tipos principais de interferências: isobáricas e poliatômicas. Interferências isobáricas referem-se a diferentes elementos que tem isótopos de mesma massa. Como exemplo, ferro e níquel tem isótopos de massa 58. Neste caso, o sinal medido na razão massa/carga (m/z) 58 terá contribuição de ambos (ferro e níquel). Interferências poliatômicas decorrem da combinação de dois ou mais isótopos de diferentes elementos, que geralmente ocorre no plasma. Um exemplo é a combinação de ArCl^+ , formado no plasma de argônio quando a amostra contém cloretos, que possui m/z 75, a mesma do As^+ . O monitoramento de diferentes isótopos e correção matemática dos sinais propensos a interferências poliatômicas são formas de minimizar estes problemas. Também é possível acoplar ao equipamento pré-colunas que retém os interferentes, minimizando interferências poliatômicas e/ou pré-concentrando os analitos. Equipamentos modernos chamados HR-ICP-MS (*High Resolution ICP-MS*) são capazes de separar elementos em frações de uma unidade atômica de massa, solucionando em grande parte os problemas de interferências isobáricas e/ou poliatômicas. Células de reação ou colisão, em que gases são adicionados para reagir ou colidir com os íons poliatômicos antes de estes atingirem o detector, também são opções para minimizar interferências. A ICP-MS pode ser considerada o estado da arte neste campo de análise por suas inúmeras vantagens, principalmente quanto aos limites de detecção alcançados e grande número de analitos por análise. Contudo, ICP-MS e ICP-OES são técnicas que demandam alto investimento em equipamentos e tem elevado custo operacional, bem como exigem treinamento extensivo dos usuários (HOLLER, F. J., SKOOG, D. A., CROUCH, S. R., 2009).

1.4.2. Espectrometria de absorção atômica

As técnicas fundamentadas na AAS baseiam-se na medida da intensidade de absorção da radiação eletromagnética, gerada por uma fonte, pelos átomos no estado fundamental. Através da medida da atenuação da radiação é possível quantificar os elementos presentes, uma

vez que a atenuação do sinal é proporcional à concentração do elemento na amostra. As principais técnicas que empregam este princípio são:

- Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectrometry*): técnica que vem sendo pouco utilizada para a análise de traços por apresentar limites de detecção maiores, em relação às demais, mas amplamente empregada na análise de cerca de 50 elementos em concentrações na faixa de mg L^{-1} ;
- Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS - *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*): técnica bastante sensível e seletiva, muito empregada na análise de traços;
- Geração química de vapor acoplada à espectrometria de absorção atômica (CVG AAS, *Chemical Vapour Generation Atomic Absorption Spectrometry*): técnica seletiva e que apresenta boa sensibilidade, mas limitada a elementos que formem hidretos ou espécies químicas voláteis, que sejam passíveis de ser vaporizados a baixas temperaturas.

A GF AAS é também conhecida como espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS, do inglês, *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*), pois após a introdução da amostra no forno de grafite é realizado o aquecimento gradual do mesmo. O programa de aquecimento progressivo do atomizador é composto por quatro etapas: secagem, em que ocorre a dessolvatação da amostra com evaporação lenta do solvente; pirólise, em que ocorre eliminação da matriz, sem vaporizar o analito; atomização, em que ocorre a produção do vapor atômico do analito, ou seja, a produção de átomos do analito no estado fundamental; e por fim a limpeza, em que são eliminados os resíduos de matriz e elementos de dentro do atomizador (HOLLER, F. J., SKOOG, D. A., CROUCH, S. R., 2009). A temperatura das sucessivas etapas do programa de aquecimento é crescente e deve ser otimizada para cada analito e matriz.

A emissão de radiação pode ser realizada no comprimento de onda específico do analito por uma fonte de linha, que pode ser uma lâmpada de cátodo oco (HCL, do inglês, *Hollow Cathode Lamp*) ou lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL, *Electrodeless Discharge Lamp*). Ou então pode ser empregada uma fonte contínua de alta energia, dando origem às técnicas de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR CS AAS, *High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*), que podem ser utilizadas acopladas à chama (HR CS FAAS), ao forno de grafite (HR CS GF AAS)

ou com geração química de vapor (CVG HR CS AAS). Os átomos do analito absorvem esta radiação, passando para o estado excitado. A quantidade de energia absorvida é proporcional à concentração de analito na amostra e pode ser medida através da quantidade da radiação da fonte que chega ao detector antes e após a absorção pelo analito.

Quando se analisam elementos voláteis pela técnica de GF AAS, é muito importante o uso de algum modificador químico, cuja função é aumentar a volatilidade da matriz, auxiliando a sua separação e eliminação durante a etapa de pirólise, e/ou reduzir a volatilidade do analito, fixando-o no tubo de grafite até a etapa de atomização. Isto permite a aplicação de temperaturas maiores de pirólise, favorecendo a eliminação de maior parte da matriz, sem perdas do analito por volatilização. O modificador químico pode ser inserido juntamente com a amostra no tubo de grafite, através do micropipetador automático, pipetando em sequência, modificador e amostra. Ou ainda o modificador químico pode ser permanente no tubo de grafite, na forma de recobrimento. Os modificadores químicos mais comumente utilizados, na forma de solução, são sais solúveis de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e misturas destes.

A GF AAS é uma técnica seletiva e que apresenta boa sensibilidade, sendo, portanto, adequada para determinar baixas concentrações de elementos em diversos tipos de amostras sólidas, líquidas e gasosas. A técnica analítica possui sensibilidade adequada para quantificar os analitos na concentração em que se encontram nas amostras que serão analisadas neste trabalho. Como serão estudados apenas dois elementos, e o laboratório em que foi realizada a parte experimental deste trabalho já opera em análises de rotina com GF AAS, fornecendo o equipamento para as análises, insumos e as instalações laboratoriais necessárias para a realização do projeto, esta foi a técnica escolhida para realização das análises. Os custos de instalação e operação também foram critérios considerados na escolha da técnica analítica.

1.5. PREPARO DE AMOSTRAS

Estudos já empregaram diferentes técnicas de preparo de amostras para análise de cádmio e chumbo em alho e outros alimentos. Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas em sistema fechado (XU et al., 2013; KENNETH, 2014), decomposição por via seca (AOAC, 1975, JIANG; LIU; HOU, 2000) e decomposição por via úmida em sistema aberto (RAMEZANI; AGHEL; AMIRABEDIN, 2012) foram aplicados com sucesso. A decomposição por via úmida assistida por radiação de micro-ondas em sistema fechado apresenta algumas vantagens em relação aos demais métodos. A menor possibilidade de contaminação, rapidez e maior eficiência de decomposição, verificada no baixo teor de carbono

residual, são benefícios obtidos devido ao emprego de temperaturas e pressões elevadas em sistema fechado. No entanto, a limitação quanto à massa de amostra é uma desvantagem. Os sistemas em via úmida abertos apresentam como vantagens a ausência de limitação quanto à massa de amostra, facilidade de operação e menor custo. A possibilidade de tratamento de várias amostras simultaneamente também é um benefício desta técnica. As desvantagens relacionadas aos sistemas abertos são a possibilidade de perdas de analitos por volatilização, contaminação cruzada entre as amostras, bem como o maior tempo necessário para a decomposição, devido às menores temperaturas e pressões empregadas. O teor de carbono residual também geralmente é mais elevado (KRUG, 2006).

1.6. VALIDAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

A validação de uma metodologia visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, de forma a assegurar que os resultados de uma análise serão confiáveis. Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012), a validação consiste de uma verificação de que os requisitos especificados são adequados para o uso pretendido.

Segundo o Manual da Garantia da Qualidade Analítica adotado pelo MAPA, os parâmetros ou critérios que deverão ser avaliados na validação (figuras de mérito) devem incluir, quando aplicável: seletividade (efeito de matriz), linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e/ou reprodutibilidade) e exatidão/recuperação (BRASIL, 2011).

Exatidão é o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando (VIM, 2012). Através deste requisito verifica-se a presença de erros sistemáticos provenientes de efeitos da extração ou decomposição, e de perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica. No presente trabalho a exatidão será avaliada através da recuperação.

Precisão é o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas (VIM, 2012). É uma estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões em condições definidas (BRASIL, 2011). Neste trabalho a precisão será avaliada através da repetitividade, ou seja, o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade de um analito que pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado como um valor exato. O LD pode ser calculado através da Equação 1 (MAPA, 2011).

$$LD = 3 \times \sigma$$

Equação (1)

Onde σ é o desvio padrão de 21 medições da amostra branca.

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito que pode ser quantitativamente determinada em uma amostra com precisão e exatidão adequadas. (INMETRO, 2011). O MAPA estabelece que o LQ do procedimento analítico é o nível mais baixo no qual foi demonstrado que os critérios de veracidade e precisão foram atendidos. Ainda, estabelece que o LQ de um procedimento analítico deve ser menor ou igual a um quinto do TMC, exceto para o chumbo, em que o LQ deve ser igual ou menor a dois quintos do TMC quando o TMC for igual ou inferior a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Desta forma, os limites de quantificação adotados serão: $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0,2 TMC) para cádmio e $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0,4 TMC) para chumbo (BRASIL, 2011).

Seletividade é a propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tais que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo (VIM, 2012). A seletividade é, portanto, a capacidade do procedimento analítico de discriminar o analito na mistura ou matriz sem interferência de outros componentes. Neste trabalho a avaliação deste parâmetro será realizada comparando as concentrações de amostras advindas do processamento da matriz com analito em solvente.

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração, e a faixa de trabalho compreende as concentrações em que a linearidade for atingida, definindo-se, assim, a curva de calibração correspondente (INMETRO, 2011).

2. OBJETIVO

Este trabalho visa a validação de uma metodologia para determinação de Cd e Pb em alho (*Allium sativum*) empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Adicionalmente, a determinação de Cd e Pb será executada em produtos disponíveis no mercado para avaliar o nível de contaminação.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar uma metodologia analítica em uso no Lanagro – RS, empregada para determinação de cádmio e chumbo em tecido animal, para a determinação destes analitos em alho.

Avaliar os parâmetros seletividade, pelo teste do efeito de matriz; exatidão, através da recuperação do analito; e precisão, através do teste de repetitividade. Determinar os limites de detecção e quantificação do método.

Analisar amostras comercializadas no estado do Rio Grande do Sul. Comparar os resultados obtidos através do método proposto com resultados de análises executadas utilizando uma metodologia de referência.

Estimar os custos da análise e comparar os custos de implantação do método proposto com o método de referência.

3. PROPOSTA TECNOLÓGICA

Este trabalho apresenta como proposta tecnológica a otimização e validação de uma metodologia analítica para determinação de cádmio e chumbo em alho (*Allium sativum*), atendendo a uma demanda do MAPA. Os critérios para a validação serão os já adotados pelo MAPA para evidenciar a eficiência do método proposto. Os resultados deste trabalho serão utilizados para implantação da tecnologia no Laboratório Nacional Agropecuário – Lanagro – RS, que será o primeiro laboratório da rede nacional de laboratórios agropecuários a realizar esta análise; ou como base para outros laboratórios de controle de qualidade de alimentos.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

Para o preparo de soluções e amostras foram utilizados reagentes de grau analítico e água purificada com resistividade de $18,18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, produzida através de ultra purificador da marca Gehaka, modelo Master System. Foram empregados ácido nítrico concentrado (HNO_3) 65% (m/m) da marca Vetec, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% da marca Alphatec, solução de nitrato de paládio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 g L^{-1} da marca PerkinElmer, nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$) da marca Sigma-Aldrich e Triton X-100 da marca Sigma-Aldrich.

As soluções de calibração (para elaboração das curvas analíticas), fortificação das amostras, e checagem (para verificação das curvas analíticas) foram preparadas a partir de soluções estoque de padrões certificados. Foram utilizados os seguintes padrões: cádmio $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e chumbo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, ambos da marca VHG, para elaboração das soluções de calibração e fortificação; e padrão multielementar de Pb $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Cd $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ da marca PerkinElmer para preparo das soluções de checagem.

4.2. LIMPEZA DO MATERIAL

Todo o material utilizado nas análises foi limpo e descontaminado de acordo com o seguinte procedimento: enxágue em água corrente por 3 vezes; imersão em solução de sabão líquido neutro 0,5% (v/v) durante 24 horas; enxágue em água corrente por no mínimo 10 vezes; imersão em solução de HNO_3 10% (v/v) por pelo menos 24 horas; enxágue com água ultrapura por no mínimo 5 vezes. Após este procedimento o material foi seco em estufa e armazenado em recipiente fechado até sua utilização.

4.3. EQUIPAMENTOS

No preparo das amostras foi utilizado liquidificador da marca Oster, modelo Osterizer, mini jarras de plástico com capacidade para 200 mL e lâminas de 4 facas em aço inox. A decomposição das amostras foi realizada em bloco digestor da marca Tecnal com capacidade para 40 tubos, controle digital de temperatura e 2200 Watts de potência. Para a decomposição de amostras assistida por micro-ondas, empregada na comparação com metodologia de referência, foi utilizado um sistema de decomposição por micro-ondas da marca CEM, modelo Mars 6, projetado para uso laboratorial, com 1800 Watts de potência. Foram empregados tubos de Teflon[®] (TFM) modelo Xpress Plus, com capacidade para 110 mL, e suporte apropriado possibilitando a decomposição de até 24 tubos simultaneamente.

As determinações de cádmio e chumbo foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite da marca PerkinElmer, modelo Pinaacle 900Z, em conjunto com amostrador automático AS 900. O gás de purga e proteção utilizado foi argônio com 99,999% de pureza da marca White Martins, com vazão de 250 mL min⁻¹ (exceto durante a etapa de atomização, em que o fluxo de gás é nulo). As fontes de radiação utilizadas foram lâmpadas EDL de Cd e Pb. A corrente de operação foi de 230 mA e 440 mA, respectivamente. A absorvância de Cd foi medida em 228,8 nm e a de Pb em 283,3 nm. A fenda espectral foi de 0,7 nm e o tempo de integração 5 s para ambos os elementos. Foi utilizado forno de grafite com plataforma integrada e revestimento pirolítico da marca PerkinElmer. A solução de limpeza utilizada entre sucessivas injeções no forno de grafite foi Triton X-100 0,5% acidificada com 0,01% de HNO₃.

Foi utilizada como modificador químico uma mistura de 0,05% de Pd(NO₃)₂ e 0,03% de Mg(NO₃)₂. As curvas analíticas foram preparadas usando branco de reagentes como ponto zero da curva e também nas diluições dos padrões. Foi utilizada solução padrão de 10 µg L⁻¹ de cádmio e 50 µg L⁻¹ de chumbo para elaboração das respectivas curvas analíticas. O equipamento faz diluições automáticas destas soluções padrão na seguinte ordem: padrão seguido pelo modificador, seguido pelo branco, introduzindo um total de 25 µL de solução, de modo a obter as curvas analíticas contendo 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg L⁻¹ de Cd e 5, 10, 20, 30 e 50 µg L⁻¹ de Pb. O critério de aceitação das curvas analíticas foi o coeficiente de correlação (r), que deve ser igual ou superior a 0,995 para que a curva analítica possa ser utilizada (BRASIL, 2011). O programa de temperatura do forno de grafite é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Programa de temperatura, tempo e vazão de gás do forno de grafite para determinação de Cd e Pb.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás (mL min ⁻¹)
Secagem	110	1	30	250
Secagem	130	15	30	250
Pirólise	1000 (Pb); 700 (Cd)	10	20	250
Atomização	1600 (Pb); 1500 (Cd)	0	5	0
Limpeza	2450	1	3	250

Fonte: adaptado de Weiler (2013).

Para as análises preliminares foram utilizadas condições instrumentais similares, à exceção das curvas analíticas. Para cádmio foi empregada curva analítica contendo 1, 2, 4, 6, 8 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e para chumbo foram utilizadas as concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.4. AMOSTRAS

Para a execução dos experimentos foi necessário buscar uma amostra branca, ou matriz branca, que é uma amostra isenta da substância a analisar ou cujo nível de concentração seja suficientemente baixo de modo a não interferir nos resultados de medição (BRASIL, 2011). A amostra de alho utilizada para o estudo de validação foi selecionada entre cinco amostras adquiridas aleatoriamente em supermercados locais. Foram realizadas análises preliminares, e dentre as amostras analisadas, uma apresentou concentrações de cádmio e chumbo desprezíveis, e esta constituiu a matriz branca. A metodologia empregada para a realização das análises preliminares foi a MET MTC/003, utilizada atualmente em escala de rotina pelo Lanagro – RS para determinação de cádmio e chumbo em tecido animal, previamente validada (DAMIN; SANTO, 2011) e acreditada pelo INMETRO, com algumas alterações:

- a) Redução da massa de amostra de 2 gramas para 1 grama;
- b) Temperatura de decomposição aumentada de 85 °C para 130 °C.

Estas alterações serão discutidas em detalhes no item 5.1.

As 5 amostras iniciais, além de outras 5 amostras adquiridas posteriormente em supermercados e fruteiras locais foram analisadas com o método validado. As amostras foram numeradas aleatoriamente de 1 a 10. Foram analisadas 7 amostras de alho *in natura* (comprados em cabeças, ou bulbos), uma amostra de alho picado, uma amostra de alho em pasta e uma amostra de alho frito.

4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS

4.5.1. Método proposto

As amostras de alho foram descascadas, separando os bulbilhos (“dentes”) e removendo a película que os recobre, a ponta e quaisquer resquícios de raiz. Os bulbilhos foram colocados na mini jarra do liquidificador e triturados até obter pedaços pequenos de cerca de 2 a 3 mm de dimensão máxima. Então as amostras foram colocadas em frasco de polipropileno e armazenadas congeladas (em freezer) até o dia da análise. Amostras adquiridas picadas ou em pasta foram analisadas sem etapa prévia de trituração.

Foi aplicada a decomposição via úmida em sistema aberto, com aquecimento em bloco digestor. Pesou-se 1 grama da amostra em tubo de vidro borosilicato graduado, e então foram adicionados 5 mL de HNO₃ concentrado. Os tubos foram aquecidos a 130 °C durante 90 minutos. Após este período os tubos foram deixados resfriar até a temperatura ambiente e foram adicionados 2 mL de H₂O₂ (30%). Após agitação, as amostras foram deixadas em repouso por 5 a 10 minutos, e então recolocadas no bloco digestor por mais 60 minutos. Ao término da decomposição, os tubos foram retirados do bloco e deixados resfriar à temperatura ambiente. Então o volume foi completado no próprio tubo até a marca de 10 mL com água ultrapura.

4.5.2. Método de referência

A metodologia de referência definida pela AOAC para análise de Pb e Cd (entre outros metais) em alimentos (AOAC, 2000) é similar ao método proposto. A principal alteração é o emprego de decomposição assistida por micro-ondas, utilizando massa de amostra de 0,2 a 0,5 gramas. Utiliza-se ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, e a determinação é realizada por GF AAS.

Pesou-se 0,5 gramas de amostra em tubo próprio para decomposição assistida por micro-ondas. Foram adicionados 5 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ (30%), e então os frascos do micro-ondas foram fechados e colocados no suporte do equipamento. Foi utilizado o seguinte programa de temperatura: 20 minutos de rampa de aquecimento; 15 minutos mantendo a temperatura em 210 °C e 20 minutos de resfriamento. Os frascos foram retirados do micro-ondas e deixados resfriar completamente. O conteúdo dos frascos do micro-ondas foi transferido para tubos de polipropileno graduados. A lavagem para transferência quantitativa foi realizada utilizando duas porções de água ultrapura de aproximadamente 2 mL, medidas em pipeta Pasteur graduada de polietileno, gotejando cuidadosamente em toda a parede interna do tubo e transferindo o líquido para o tubo graduado. O volume foi completado a 11 mL, ao invés de 25 mL, conforme descrito no método AOAC, para evitar a diluição excessiva da solução decomposta.

4.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de uma metodologia envolve a verificação de uma série de parâmetros, entre eles a seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão ou recuperação. Como o presente estudo trata-se de uma extensão de escopo, ou seja, será incluída uma nova matriz em um método já validado anteriormente pelo laboratório, serão

verificados os critérios: seletividade / efeito de matriz, veracidade / recuperação e repetitividade. Os limites de detecção e quantificação também serão determinados.

4.6.1. Recuperação

A recuperação foi avaliada através da análise da matriz branca antes e após fortificação em dois níveis (alto e baixo), em seis replicatas. Os níveis de fortificação foram definidos de acordo com o TMC e os requisitos estabelecidos pelo MAPA (BRASIL, 2011). Foram adotados os limites de 0,2 TMC ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 1,0 TMC ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) para cádmio e 0,4 TMC ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 1,0 TMC ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) para chumbo. Os valores de fortificação e TMC para os analitos estudados encontram-se na Tabela 3. O valor do TMC é definido pelo MAPA de acordo com a orientação da ANVISA, sendo os limites: $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Cd e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Pb (ANVISA, 2013).

Tabela 3 – TMC e níveis de fortificação da matriz branca.

Fortificação	Cádmio ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Chumbo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
0,2 TMC	10	-
0,4 TMC	-	40
1,0 TMC	50	100

Fonte: a autora.

A recuperação (*rec*) é calculada de acordo com a Equação (2):

$$rec = \frac{c_f - c_{nf}}{c_{ad}} \times 100$$

Equação (2)

Onde:

c_f = concentração medida após fortificação da “matriz branca”;

c_{nf} = concentração medida na “matriz branca” não fortificada;

c_{ad} = concentração do analito adicionado à “matriz branca”.

Critério de aceitação: a recuperação, calculada através da Equação (2), deve estar compreendida no intervalo apresentado na Tabela 4, de acordo com a concentração em que foi realizada a fortificação. Desta forma, no presente trabalho o intervalo de aceitação da recuperação é de 80% a 110% para todos os níveis de fortificação de ambos os analitos (BRASIL, 2011).

Tabela 4 – Intervalo de aceitação da recuperação.

Concentração (C)	Recuperação
$C \leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	50% a 120%
$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C \leq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	70% a 110%
$C \geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	80% a 110%

Fonte: BRASIL, 2011.

4.6.2. Repetitividade

A repetitividade foi avaliada através da análise da matriz branca fortificada em dois níveis, em seis replicatas. Foram adotados os mesmos níveis de fortificação utilizados para determinação da recuperação, de forma que parte dos experimentos foi utilizada para avaliação de ambos os critérios. Para cada nível de concentração foi calculada a concentração média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR_r). Foi calculado para cada nível o desvio padrão relativo teórico ($DPR_{Horwitz}$), utilizando a equação de Horwitz – Equação (3):

$$DPR_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Equação (3)

Onde:

C é a concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) x 10^{-9} .

Calculou-se também o valor de HORRAT em condições de repetitividade ($HORRAT_r$) de acordo com a Equação (4):

$$HORRAT_r = \frac{DPR_r}{PDPR_r}$$

Equação (4)

Onde:

$PDPR_r$ = desvio padrão relativo predito – Equação (5)

$$PDPR_r = 2 \times C^{-0,15}$$

Equação (5)

C é a concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) x 10^{-9} .

Critério de aceitação: O desvio padrão relativo (DPR_r) da média deve ser menor que dois terços do $DPR_{Horwitz}$. Adicionalmente, os valores de $HORRAT_r$ devem ser inferiores a 1 (BRASIL, 2011).

4.6.3. Seletividade e efeito de matriz

Nos dois níveis de concentração já citados foram preparadas seis replicatas nas condições abaixo:

- I. Amostra não matrizada: analito em solvente puro (branco de reagentes).
- II. Amostra matrizada: analito em matriz branca. Utilizam-se os mesmos experimentos empregados na avaliação da recuperação.

As amostras matrizadas e não matrizadas foram submetidas ao processo completo de aquecimento e decomposição por via úmida, e suas concentrações foram medidas de acordo com o método proposto.

Critério de aceitação: A variação máxima permitida entre a média do valor obtido para cada nível de concentração das amostras fortificadas e as soluções padrão não deve ser superior a 10% (BRASIL, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

A metodologia empregada no estudo de validação foi adaptada a partir do MET MTC/003 (DAMIN; SANTO, 2011), para alcançar os resultados requeridos. Inicialmente, foram otimizadas as condições de decomposição das amostras, conforme já citado no item 4.4.

A redução da massa da amostra de 2 gramas para 1 grama foi realizada para melhorar o processo de decomposição, pois verificou-se que a quantidade menor foi decomposta de maneira mais rápida e eficiente, com base na ausência de material suspenso em solução. Além disso, algumas das matrizes analisadas pelo método original contém de 75 a 80% de umidade (BELITZ; GROSCH, 2009), podendo chegar a até 90% (MURRAY; BURT, 2001). O alho contém cerca de 60% (PURANIK et al., 2012), assim, devido ao menor teor de umidade utilizou-se massa menor de amostra.

A temperatura de decomposição foi aumentada de 85 °C para 130 °C, pois na primeira temperatura a decomposição foi incompleta, observada visualmente através da presença de sólidos remanescentes em suspensão. O aumento da temperatura proporcionou decomposição completa de toda a amostra. Análises realizadas em triplicata nestas condições, após a otimização das condições de decomposição, resultaram nas recuperações médias mostradas na Tabela 5 – Condição A.

Então foi modificada a diluição final das amostras, que foi alterada de 15 mL para 10 mL para proporcionar valores maiores de leitura instrumental e possibilitar a quantificação de concentrações mais baixas (Tabela 5 – Condição B).

Tabela 5 – Recuperações médias empregando o MET/MTC/003/011, com alteração de massa de amostra e temperatura de decomposição (Condição A) e alterando também a diluição das amostras (Condição B).

Concentração	Cd		Pb	
	0,2 TMC	TMC	0,4 TMC	TMC
	10 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	40 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
% Recuperação – Condição A	74,0	82,8	55,2*	82,8
% Recuperação – Condição B	85,0	102,6	75,6	97,7

Fonte: a autora.

* Recuperação para a concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Condição A: massa de amostra reduzida de 2 gramas para 1 grama; temperatura de decomposição aumentada de 85 °C para 130 °C. Condição B: massa de amostra reduzida de 2 gramas para 1 grama; temperatura de decomposição aumentada de 85 °C para 130 °C; diluição final alterada de 15 mL para 10 mL.

Observou-se que, mesmo após as alterações empregadas na condição B, a recuperação no nível mais baixo não atendeu aos critérios estabelecidos para chumbo, e ficou próxima ao limite para cádmio. Então procederam-se novos ajustes, e foram otimizadas as curvas analíticas. Originalmente as curvas analíticas contém padrões nas seguintes concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e 1, 2, 4, 6, 8 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd. As curvas analíticas foram alteradas, de forma a obter 5, 10, 20, 30 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd. Os resultados obtidos após estes ajustes atenderam aos critérios e estão mostrados detalhadamente no item 5.2.

É válido salientar que a otimização das curvas de pirólise e atomização não será discutida neste trabalho, pois seguem as condições do método já validado (DAMIN; SANTO, 2011) e foram avaliadas anteriormente (WEILER, 2013).

5.2. PARÂMETROS DE MÉRITO

5.2.1. Recuperação

Na Tabela 6 são mostrados os resultados experimentais para a recuperação em cada nível de fortificação, para ambos os analitos, obtidos conforme descrito em 4.6.1. As leituras instrumentais foram realizadas em duplicata, e os resultados exibidos correspondem à média.

Tabela 6 – Recuperação dos analitos adicionados à matriz branca.

Replicata	Fortificação	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor Teórico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
1			9,88	10,08	102,0
2			9,78	9,38	96,0
3	0,2 TMC	10	9,97	10,22	102,5
4			9,67	9,77	101,0
5			9,78	9,78	100,0
6			10,02	10,17	101,5
Cd	Média			9,83	100,5
1			49,85	50,30	100,9
2			48,92	48,78	99,7
3	1,0 TMC	50	49,12	47,30	96,3
4			49,46	49,60	100,3
5			49,85	51,25	102,8
6			49,07	48,63	99,1
	Média			49,31	99,9
1			39,53	35,55	84,9
2			38,68	37,45	96,8
3	0,4 TMC	40	39,64	36,64	92,4
4			39,53	34,77	88,0
5			39,22	36,05	91,9
6			40,08	36,03	89,9
Pb	Média			35,75	90,7
1			99,50	93,90	94,7
2			97,94	84,06	85,8
3	1,0 TMC	100	99,70	87,26	87,5
4			99,01	89,84	90,7
5			97,85	89,92	91,9
6			98,23	88,40	90,0
	Média			88,90	90,1

Fonte: a autora.

Verificou-se que as recuperações de cádmio apresentaram valores entre 96,0% e 102,0% para o nível de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, e de 96,3% a 102,8% para o nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores médios de recuperação foram de 100,5% e 99,9%, respectivamente. Para o chumbo as recuperações variaram entre 84,9% e 96,8% para a concentração de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ e entre 85,8% e 94,4% para a concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. As recuperações médias foram, respectivamente, 90,7% e 90,1%. Todos os resultados foram aprovados quanto ao critério de recuperação (80% a 110%).

5.2.2. Repetitividade

A Tabela 7 mostra os resultados calculados de acordo com o item 4.6.2 a partir dos dados experimentais e teóricos de desvios padrão para cada concentração. Observa-se que os desvios padrão obtidos para cada concentração são inferiores ao desvio padrão máximo aceitável, indicando que o método está aprovado quanto ao critério de repetitividade.

Tabela 7 – Resultados dos cálculos de desvios padrão relativos predito e teórico, resultados experimentais, critérios de aprovação e resultados para avaliação da repetitividade.

Parâmetro	Cd		Pb	
	0,2 TMC	TMC	0,4 TMC	TMC
	10 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	40 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
$DPR_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)}$	32,00	25,12	25,97	22,63
$2/3 DPR_{Horwitz}$	21,33	16,74	17,32	15,08
$PDPR_r = 2 \times C^{-0,15}$	31,70	24,90	25,75	22,44
Concentração Média	9,83	49,31	35,75	88,90
DP	0,37	1,64	2,16	3,27
DPR _r	3,74	3,32	6,04	3,68
$HORRAT_r = \frac{DPR_r}{PDPR_r}$	0,12	0,13	0,23	0,16
Critérios				
$DPR_r < 2/3 DPR_{Horwitz}$	3,74 < 21,33	3,32 < 16,74	6,04 < 17,32	3,68 < 15,08
	Aprovado		Aprovado	
$HORRAT < 1$	0,12 < 1	0,13 < 1	0,23 < 1	0,16 < 1
	Aprovado		Aprovado	

Fonte: a autora.

5.2.3. Seletividade e efeito de matriz

A Tabela 8 mostra os resultados médios de concentração obtidos para as amostras preparadas conforme o item 4.6.3, ou seja, amostras não matrizadas (analito em solvente puro) e amostras matrizadas (analito em matriz branca). As leituras foram realizadas em duplicata.

Tabela 8 – Resultados das médias de concentração obtidas para as amostras não matrizadas e amostras brancas fortificadas (amostras matrizadas). Diferenças das médias e resultado do estudo do efeito de matriz.

Concentração	Cd		Pb	
	0,2 TMC 10 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	TMC 50 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,4 TMC 40 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	TMC 100 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Amostras não matrizadas	9,73	50,98	39,17	97,75
Amostras matrizadas	9,83	49,31	35,75	88,90
Diferença das Médias	0,11	-1,67	-3,42	-8,85
Diferença / Valor Teórico (%)	1,07	-3,35	-8,54	-8,85
Critério	10,00			
Resultado	Aprovado			

Fonte: a autora.

Para o cádmio, observa-se que a diferença entre as amostras matrizadas e não matrizadas foi de 1,07% para o nível mais baixo ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 3,35% para o nível mais alto ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), calculadas em relação os valores teóricos de concentração. Isto indica que a presença da matriz não afetou o sinal do analito. Para chumbo verifica-se que a diferença foi de 8,54% para o nível mais baixo ($40 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 8,85% para o nível mais alto ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). Desta forma, ambos os analitos atenderam ao critério de aceitação para declaração de inexistência de efeito de matriz. No entanto, para o chumbo foi percebida algum efeito de interferência da matriz, ainda que dentro dos limites aceitáveis, pois para ambos os níveis as concentrações das amostras matrizadas foram cerca de 9% mais baixas do que as das amostras não matrizadas.

5.2.4. Equação linear e limite de detecção

As curvas analíticas obtidas para os analitos estudados, bem como os respectivos coeficientes de correlação (r) são mostradas na Tabela 9. Também são mostrados os desvios padrão de 21 medições da amostra branca e o limite de detecção calculado para cada analito de acordo com a Equação 1.

Tabela 9 – Equação da reta da curva analítica e respectivo coeficiente de determinação (r), desvio padrão de 21 leituras da amostra branca (σ), e limite de detecção calculado para cada analito.

Analito	Equação linear	Coeficiente de correlação (r)	Desvio padrão (σ)	Limite de detecção	
				($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cd	$y = 0,05356 x + 0,02025$	0,996450	0,004976	0,015	0,15
Pb	$y = 0,00251 x + 0,000254$	0,999904	0,045255	0,136	1,36

Fonte: a autora.

Os limites de detecção alcançados estão de acordo com o esperado, considerando que a bibliografia reporta como limites de detecção típicos $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb para esta técnica analítica (HOLLER, F. J., SKOOG, D. A., CROUCH, S. R., 2009). Estudos anteriores obtiveram limites de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e $0,075 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb (XU et al., 2013), utilizando a mesma técnica analítica para análise de cádmio e chumbo em diversos alimentos, incluindo alho. Os limites de detecção foram calculados em $\mu\text{g kg}^{-1}$ considerando a massa de 1 grama de amostra e a diluição de 10 mL.

5.3. AMOSTRAS ANALISADAS

5.3.1. Método proposto

Foram analisadas 10 amostras adquiridas em supermercados e fruteiras locais, cuja descrição está apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Descrição das amostras analisadas.

Amostra	Descrição
1	Marca A – Alho roxo selecionado. Apresentação: rede plástica com 200 gramas. Origem: China.
2	Marca A – Alho roxo selecionado. Apresentação: saco plástico com 200 gramas. Origem: SI*.
3	Marca B – Alho fresco. Apresentação: saco plástico com 200 gramas. Origem: China.
4	Marca C – Alho frito crocante sem sal. Apresentação: saco plástico com 30 gramas. Origem: SI.
5	Alho granel. Origem: SI.
6	Marca D – Pasta de alho sem sal. Apresentação: pote plástico com 200 gramas. Contém antioxidante ácido cítrico. Origem: SI.
7	Marca E – Alho puro picado. Apresentação: pote plástico com 200 gramas. Contém água, antioxidantes e amido modificado. Origem: SI.
8	Alho granel. Origem: SI.
9	Alho granel. Origem: Noruega
10	Marca F – Alho nobre roxo. Apresentação: saco plástico com 200 gramas. Origem: Goiás.

Fonte: a autora.

Na Tabela 11 são mostradas as concentrações de cádmio e chumbo encontradas para as amostras analisadas de acordo com a metodologia validada. As amostras foram analisadas em duplicata. As leituras instrumentais também foram efetuadas em duplicata. Os resultados apresentados correspondem à média, e entre parênteses é mostrado o desvio padrão das concentrações das duas replicatas para as amostras quantificadas.

*SI – Sem informação declarada de origem.

Tabela 11 – Concentrações de Cd e Pb nas amostras analisadas.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Pb	Cd
1	(< LQ)	(<LQ)
2	(< LQ)	(<LQ)
3	(< LQ)	48,62 ($\pm 1,59$)
4	(< LQ)	41,73 ($\pm 0,94$)
5	(< LQ)	(<LQ)
6	(< LQ)	10,53 ($\pm 0,38$)
7	(< LQ)	(<LQ)
8	(< LQ)	13,40 ($\pm 1,87$)
9	(< LQ)	22,93 ($\pm 2,04$)
10	(< LQ)	(< LQ)

Fonte: a autora.

Para todas as amostras a concentração de chumbo foi menor que o limite de quantificação do método. Já para cádmio foi possível quantificar o contaminante em 50% das amostras avaliadas.

Nas amostras de alho fresco *in natura* em que foi quantificado cádmio (amostras números 3, 8 e 9) é provável que a contaminação seja oriunda do próprio processo de cultivo, uma vez que o processamento destes produtos é mínimo e envolve apenas a secagem (ou cura), armazenamento e classificação por tamanho (RESENDE; DUSI; MELO, 2004). Entre principais possíveis fontes de contaminação pode-se citar a contaminação do solo ou água de irrigação por fontes industriais e o emprego de fertilizantes fosfatados contaminados (SMOLDERS; MERTENS, 2012, LIU et al., 2008, KHAN et al., 2017).

As amostras de alho que sofreram processos posteriores, ou seja, amostras 4, 6 e 7 de alho frito, em pasta e picado, respectivamente, estão propensas a outras fontes de contaminação decorrentes do pós-processamento. As etapas adicionais a que foram submetidas estas amostras (descasque, trituração, fritura e envase) podem ser fontes de contaminação externa ou cruzada. Dentre estas amostras, a número 4 (alho frito) e a número 6 (pasta de alho) apresentaram concentrações quantificáveis de cádmio.

É importante salientar que em uma amostragem pequena foi observada a presença de cádmio em concentrações superiores ao limite de quantificação em 50% das amostras, algumas

em níveis próximos ao limite permitido. Isto indica que o monitoramento deste contaminante deve ser sistematicamente executado, a fim de impedir que produtos impróprios sejam comercializados e consumidos pela população.

5.3.2. Comparação com método de referência

O método validado foi comparado com a metodologia de referência definida pela AOAC para análise de Pb e Cd em alimentos (AOAC, 2000). Para a comparação entre os métodos, foi selecionada a amostra número 3. Como esta amostra era naturalmente isenta de chumbo, este analito foi adicionado. O volume final de diluição empregado no método AOAC foi alterado de 25 mL para 11 mL, visando evitar a diluição excessiva da solução, e aumentar a magnitude das medidas instrumentais, conforme indicado em 4.5.2. Esta alteração foi realizada porque análises executadas nas condições originais propostas no método AOAC resultaram em concentrações mais baixas que as esperadas, e altos desvios padrão. Estes dados não serão apresentados neste texto. Os resultados obtidos com o método AOAC adaptado ao volume final de 11 mL são apresentados na Tabela 12, e comparados com os resultados do método proposto. As análises foram executadas em triplicata.

Tabela 12 – Resultados comparativos do teor de cádmio e chumbo pelo método de referência e pelo método proposto.

Replicata	Método AOAC		Método Proposto	
	Concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Pb	Cd	Pb	Cd
Média	115,82	49,22	121,70	48,62
Desvio Padrão	2,66	1,59	8,02	1,59

Fonte: a autora.

Realizou-se o teste F de Fisher-Snedecor para verificar se a variância (medida da precisão) das amostras foi equivalente. Para os dois analitos a condição de igualdade entre as variâncias foi atendida, com nível de confiança de 95%. Então foi realizado o teste t de *Student* para avaliar se as médias das concentrações poderiam ser consideradas estatisticamente equivalentes, considerando que as amostras possuem variâncias equivalentes. O teste indicou que, com um nível de confiança de 95%, os resultados obtidos pelos dois métodos podem ser considerados estatisticamente equivalentes para ambos os analitos.

6. ESTIMATIVA DO CUSTO DA ANÁLISE

Foi realizada a estimativa do custo de uma análise considerando o gasto com reagentes, gás argônio, eletricidade, salário médio de um técnico em química, custo de descarte de resíduos e itens consumíveis do equipamento. Os custos de cada insumo são mostrados na Tabela 13. A fonte de consulta dos custos dos insumos foi o Painel de Preços, do portal de compras governamentais (PAINEL DE PREÇOS, 2018). O salário de um técnico em química foi consultado em um conhecido site de comparação de salários (LOVE MONDAYS, 2018). O custo da energia elétrica foi obtido no site da Companhia Estadual de Energia Elétrica (CEEE) (PORTO ALEGRE, 2018), e o custo de consumíveis foi obtido através de orçamentos do fabricante. Realizou-se uma estimativa do custo da análise de cádmio e chumbo em alho utilizando a técnica empregada neste estudo (GF AAS) e dos custos de implantação considerando diferentes sistemas de decomposição de amostra (aberto e fechado). Na Tabela 14 são apresentadas as quantidades e valores de cada insumo, bem como o custo total da análise, considerando a execução de uma única replicata.

Tabela 13 – Custo dos insumos utilizados nas análises e para descarte dos resíduos gerados.

Insumo	Quantidade	Custo
Ácido nítrico P.A.	1 L	R\$ 46,72
Peróxido de hidrogênio P.A.	1 L	R\$ 17,00
Gás de argônio – grau de pureza 5.0	1 m ³	R\$ 28,89
Energia elétrica	1 kWh	R\$ 0,609
Técnico em química	1 mês	R\$ 3.361,00
Descarte de resíduos	1 kg	R\$ 14,28
Triton X-100	100 mL	R\$ 62,00
Solução padrão de Cd 10 mg kg ⁻¹	100 mL	R\$ 127,59
Solução padrão de Pb 10 mg kg ⁻¹	125 mL	R\$ 140,00
Nitrato de Pd 10 g L ⁻¹	100 mL	R\$ 207,50
Nitrato de Mg P.A.	500 g	R\$ 84,28

Fontes: PAINEL DE PREÇOS, 2018; LOVE MONDAYS, 2018; PORTO ALEGRE, 2018.

Tabela 14 – Quantidade e custo de cada insumo utilizado na análise.

Insumo	Quantidade	Custo
Ácido nítrico PA (mL)	5	R\$ 0,23
Peróxido de hidrogênio PA (mL)	2	R\$ 0,03
Gás de argônio 5.0 (L)	1,05	R\$ 0,03
Eletricidade – GF AAS (kWh)	0,21	R\$ 0,13
Eletricidade – Preparo de Amostra (kWh)	0,06	R\$ 0,04
Técnico em química (h)	0,07	R\$ 1,33
Resíduos (kg)	0,015	R\$ 0,21
Consumíveis	1	R\$ 2,60
TOTAL		R\$ 4,60

Fontes: PAINEL DE PREÇOS, 2018; LOVE MONDAYS, 2018; PORTO ALEGRE, 2018.

Algumas considerações foram adotadas para simplificação do cálculo, foram elas:

- a) Gasto de água, energia elétrica e mão de obra para lavagem, descontaminação e secagem do material não foi considerado, bem como o custo da água ultrapura.
- b) Foi adotada a estimativa de custo da energia elétrica na etapa de preparo de amostras em sistema aberto (R\$ 0,037), cujo valor difere do calculado para sistema fechado (R\$ 0,013), mas afeta pouco o custo da análise. Para estes cálculos foram considerados:
 - I. Número de amostras por decomposição;
 - II. Potência média utilizada do equipamento;
- c) O tempo de análise por GF AAS considerado foi 110 segundos (o tempo do programa mostrado na Tabela 2 foi acrescido de 20 segundos referentes à etapa de resfriamento do forno de grafite, executado entre sucessivas injeções, e 2 segundos correspondentes ao tempo de deslocamento da haste do amostrador automático), permitindo, desta forma, a análise de 114 amostras por dia.
- d) Para contabilização de número de amostras foi considerado 1 h para *set-up*, aquecimento e estabilização da lâmpada, e eventual elaboração de curvas analíticas, e 7 h de análise por dia de trabalho. Foram considerados 21 dias úteis de trabalho no mês. Não foram considerados encargos trabalhistas.
- e) O custo de descarte de resíduos foi considerado como o custo médio dos últimos descartes praticados pelo Lanagro – RS, de aproximadamente R\$ 15,00 por quilograma de resíduo. Foi considerada a densidade dos resíduos gerados igual a 1000 kg/m³.

- f) A quantidade de resíduos gerada nas análises foi considerada 15 mL para estimar o total de resíduos gerados:
- I. 10 mL de resíduos de amostra;
 - II. Resíduos da etapa de lavagem do micropipetador entre injeções;
 - III. Resíduos provenientes de outras etapas (resíduos de padrões para elaboração das curvas analíticas, resíduos de ácido para descontaminação, etc.).
- g) Para soluções padrão, modificadores e Triton X-100 foi considerada a compra de uma unidade para 2 anos de utilização.
- h) Na estimativa de custo dos consumíveis foram adotados os seguintes valores:
- I. Custo de um tubo de grafite de aproximadamente R\$ 900,00, quando comprado em kit de 20 unidades; durabilidade de um tubo de grafite de 400 ciclos de aquecimento (queimas);
 - II. Cilindros de contato, lâmpadas, copos do amostrador, capilares e outros consumíveis custando R\$ 10.000,00 por ano.

O custo da análise foi estimado em R\$ 4,60 por amostra. Este valor teria uma pequena redução caso fosse utilizado o sistema fechado de decomposição de amostra, resultando em um custo de R\$ 4,57 por amostra. Estes custos são valores de referência, mas mostram que os insumos que mais impactam no custo da análise são os itens consumíveis do forno de grafite e a mão de obra. A frequência analítica dos sistemas de preparo de amostras foi considerada equivalente, uma vez que ambos os métodos possibilitam o preparo de aproximadamente 100 amostras por dia por equipamento, e ambos apresentaram resultados satisfatórios nas análises comparativas.

Quanto ao impacto ambiental, os sistemas de decomposição de amostras podem ser considerados diferentes. O sistema aberto causa a liberação de óxidos de nitrogênio em quantidade apreciável durante o aquecimento, enquanto nos sistemas fechados ocorre a regeneração de ácido nítrico no interior do recipiente fechado, minimizando o lançamento de gases nocivos à atmosfera (BARELA et al., 2017).

Outro fator importante na determinação da técnica analítica é o investimento em equipamento e estrutura laboratorial. Os sistemas de decomposição de amostras comparados apresentam custos bastante diferentes. Um bloco digestor com capacidade para até 50 tubos custa cerca de R\$ 2.850,00. Cada tubo de vidro borossilicato graduado tem valor médio de R\$ 25,00. Para a compra de 100 tubos o investimento seria de R\$ 2.500,00. O custo total para compra do digestor e 100 tubos é estimado em R\$ 5.350,00 (PAINEL DE PREÇOS, 2018). Já

um equipamento digestor por micro-ondas tem custo estimado de R\$ 150.000,00, e normalmente é vendido com um conjunto de 24 tubos de Teflon[®] apropriados. O custo de cada tubo vendido separadamente é de aproximadamente R\$ 4.000,00. Considerando a compra de 76 tubos, o investimento seria de R\$ 304.000,00. O custo total para a compra de um digestor por micro-ondas (acompanhado de 24 tubos) e 76 tubos adicionais é de aproximadamente R\$ 454.000,00.

O custo de um espectrômetro de absorção atômica pode variar bastante, conforme a tecnologia, fabricante, acessórios e recursos do instrumento. Estima-se (GRINDSTAFF; SCHROEDER, 2011) que o investimento em um GF AAS esteja entre US\$ 30.000 e US\$ 65.000 (R\$ 120.000 a R\$ 260.000,00), sendo a cotação do dólar estimada de US\$ 1,00 equivalendo a R\$ 4,00.

O custo de implantação das diferentes técnicas é mostrado na Tabela 15. Não estão contemplados os investimentos em infraestrutura laboratorial, pois estes podem variar bastante, de acordo com as condições pré-existentes em cada laboratório.

Tabela 15 – Custo de implantação das diferentes metodologias analíticas.

Técnica Analítica	Sistema de Decomposição	Custo de Implantação*
GF AAS	Aberto (bloco digestor)	RS 195.350,00
GF AAS	Fechado (micro-ondas)	R\$ 644.000,00

Fonte: a autora.

Em geral, para a escolha da técnica analítica e sistema de decomposição de amostra deve-se considerar: o número semanal de amostras, o tipo de amostra, o número de elementos a serem determinados, as concentrações e limites, o volume de amostra disponível, outros acessórios que possam ser necessários, o investimento inicial e custos de manutenção, bem como o nível de habilidade do operador. (TYLER, 2018).

Para as análises realizadas neste estudo concluiu-se que a metodologia utilizada é a mais apropriada por apresentar menor custo de análise, menor investimento para implantação, limites de quantificação adequados, além da existência de equipamentos e estrutura laboratorial completa para a realização do procedimento analítico.

* Considerado o valor médio de um GF AAS como R\$ 190.000,00.

7. CONCLUSÃO

A determinação de Cd e Pb em alho por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite empregando decomposição em sistema aberto pode ser considerada adequada para o uso pretendido. Os resultados apresentados ao longo deste trabalho demonstraram que o método foi adequadamente otimizado, atendendo todos os critérios dos parâmetros de validação, e indicam que a metodologia empregada produz resultados equivalentes à metodologia de referência proposta pela AOAC. O método apresentou viabilidade técnica e econômica, proporcionando aplicabilidade imediata.

Os parâmetros de validação (seletividade, exatidão e precisão) foram avaliados em dois níveis (LQ e TMC). A seletividade foi avaliada através da análise de efeito de matriz, sendo demonstrado para ambos os analitos que o método atende ao critério estabelecido para a inexistência de interferência da matriz da amostra no resultado analítico do método. A veracidade foi verificada através da recuperação sendo obtidos resultados médios de 90,7% e 90,1% para Pb, e 100,5% e 99,9% para Cd, respectivamente, nos níveis LQ e TMC. Estes resultados atendem ao critério para estes níveis de concentração. A precisão do método foi avaliada através do teste de repetitividade, sendo considerada aprovada. Os limites de detecção foram determinados, sendo obtidos $0,15 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Cd e $1,36 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Pb. Os limites de quantificação foram de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Cd e $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Pb.

A metodologia validada foi empregada na determinação das concentrações dos analitos em 10 amostras. A concentração de chumbo apresentou resultados inferiores ao limite de quantificação do método para todas amostras analisadas. Para cádmio foi possível quantificar o analito em 5 amostras. Todas as amostras apresentaram concentração inferior aos limites máximos permitidos pela ANVISA e Codex Alimentarius. No entanto, mesmo com a pequena amostragem foi encontrado um número considerável de amostras com concentração de cádmio quantificável, algumas delas com valores próximos ao limite máximo permitido. Isto mostra que o monitoramento deve ser implantado e ampliado, a fim de controlar a qualidade dos produtos consumidos no país.

Ainda, como sugestão para trabalhos futuros, é apontada a oportunidade de validação de uma metodologia para análise de arsênio em alho. Este é um contaminante igualmente importante, cujo limite já foi estabelecido pela ANVISA e, portanto, há interesse no monitoramento das concentrações deste analito na matriz estudada.

8. REFERÊNCIAS

1. ALLOWAY, Brian J. (Ed.). Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. **Environmental Pollution**, v. 22, n. 3, p.1-615, 2012.
2. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 42, de 29 de agosto de 2013. **Regulamento Técnico Mercosul Sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos**. Brasília, DF, 30 ago. 2013. Seção 1, p. 33-35. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 12 jul. 2018.
3. AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **JAOAC 58: 982.23 – Cadmium and Lead in Food**. 15 ed. Virginia: Association of Official Analytical Methods, 1975. 771 p.
4. AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **J. AOAC 83: 999.10 – Lead, Cadmium, Copper, and Iron in Foods; Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion**. 83 ed. Virginia, 2000. 1189 p.
5. BAKHSHAYESH, B.; DELKASH, M.; SCHOLZ, M. Response of Vegetables to Cadmium-Enriched Soil. **Water**, v. 6, n. 5, p.1246-1256.
6. BELITZ, H.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4. ed. Leipzig: Springer, 2009. 1114 p.
7. BRASIL. Instrução Normativa nº 48, de 12 de dezembro de 2017. Brasília, DF, 18 dez. 2017. Seção 1, p. 41-44.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227 p. ISBN 978-85-7991-055-5
9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (Org.). **PLANO NACIONAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL: PNCRC/VEGETAL**. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 ago. 2018.
10. BRASÍLIA. Maria Helena Fagundes. Conab - Companhia Nacional de Abastecimento (Org.). **CONJUNTURA MENSAL**. 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2018.
11. CHA, C. A Study on the Effect of Garlic to the Heavy Metal Poisoning of Rat. **Journal Of Korean Medical Science**, v. 2, n. 4, p.213-223.
12. CHINA. The Ministry Of Environmental Protection. The Ministry Of Land And Resources Report. **National soil contamination survey**. 2014. Disponível em: <http://www.gov.cn/foot/2014-04/17/content_2661768.htm>. Acesso em: 14 ago. 2018.
13. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CF/11 INF/1: Working Document for Information and Use in Discussions Related to Contaminants and Toxins in the GSCTFF**. 2017. 162 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/>>. Acesso em: 18 ago. 2018.
14. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CODEX STAN 193: CODEX GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED**. 1995.

65 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

15. DAMIN, I. C. F.; SANTO, M. A. B. E. **Determinação de microelementos (cádmio e chumbo) por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite – GF AAS**. Porto Alegre, 2011. 43 p.
16. EFSA: European Food Safety Authority. Cadmium dietary exposure in the European population. **Efsa Journal**, v. 10, n. 1, p.2551-2588.
17. FRANCE. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization (Org.). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Cadmium and Cadmium Compounds. **Iarc Monographs**, v. 100-C, p.121-145, 2012. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr>>. Acesso em: 7 ago. 2018.
18. FRANCE. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization (Org.). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Inorganic and Organic Lead Compounds. **Iarc Monographs**, v. 87, p.370-378, 10 fev. 2006. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr>>. Acesso em: 7 ago. 2018.
19. GODT, J. et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 22, n. 1, p.22-27, 10 set. 2006.
20. GRINDSTAFF, J.; SCHROEDER, C. Heavy Metals Testing (USP) Revisions: New Limits & Procedures for Elemental Impurities in Pharmaceuticals & Dietary Supplements. **Drug Development & Delivery**, v. 3, n. 11, p.67-70.
21. HOLLER, F. J., SKOOG, D. A., CROUCH, S. R., **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Bookman, 2009.
22. HU, H.; JIN, Q.; KAVAN, P. A Study of Heavy Metal Pollution in China: Current Status, Pollution-Control Policies and Countermeasures. **Sustainability**, v. 6, n. 9, p.5820-5838.
23. HU, W. et al. Soil environmental quality in greenhouse vegetable production systems in eastern China: Current status and management strategies. **Chemosphere**, v. 170, p. 183 - 195.
24. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008-Rev.04, 2011.
25. ITALY. JAN A. European Food Safety Authority (Org.). Cadmium in Food: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **The Efsa Journal**. p. 1-3. 2009.
26. JÄRUP, L. et al. Health effects of cadmium exposure: a review of the literature and a risk estimate. **Scandinavian Journal Of Work, Environment & Health**. 1998. p. 240-291.
27. JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, v. 68, n. 1, p.167-182.
28. JIANG, W.; LIU, D.; HOU, W. Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.). **Bioresource Technology**, v. 1, n. 76, p.9-13, 2000.
29. KHAN, M. A. et al. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. **Science Of The Total Environment**, v. 601-602, p.1591-1605, 2017.

30. KENNETH ONG (Usa). Perkinelmer. **Determination of Lead and Cadmium in Foods by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy**. 2014. Disponível em: <https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_PinAAcle-900H-Lead-Cadmium-in-Food-011965_01.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2018.
31. KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras**: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 6º Ed. Santa Maria, 2006. 282p.
32. LI, B. et al. Highly efficient removal of lead and cadmium during wastewater irrigation using a polyethylenimine-grafted gelatin sponge. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.33573-33582, 2016.
33. LIU, D. et al. Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 1, p.134-143, 2008.
34. LOVE MONDAYS (São Paulo). Love Mondays (Org.). **Salários de Técnico Químico**. 2018. Disponível em: <<https://www.lovemondays.com.br/salarios/cargo/salario-tecnico-quimico>>. Acesso em: 27 set. 2018.
35. LUCINI, M. A. (Brasil). Associação Nacional dos Produtores de Alho. **ACOMPANHAMENTO CONJUNTURAL DO ALHO**: Janeiro de 2017. Disponível em: <<http://anapa.com.br/conjuntura/>>. Acesso em: 14 ago. 2018.
36. LUO, Y.; TU, C. **Twenty Years of Research and Development on Soil Pollution and Remediation in China**. Springer, 2018. 814 p.
37. MURRAY, J.; BURT, J. R.; **The Composition of Fish**. Ministry of Technology. Torry Advisory Note N° 38. Torry Research Station, 2001.
38. NWOKOCHA, C. R. et al. Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of wistar rats. **Food And Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p.222-226, 2012.
39. OBIOHA, U. E. et al. Hepatoprotective Potentials of Onion and Garlic Extracts on Cadmium-Induced Oxidative Damage in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 129, n. 1-3, p.143-156, 2008.
40. PAINEL DE PREÇOS. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão. Disponível em: <<http://paineldeprecos.planejamento.gov.br/>>. Acesso em: 17 set. 2018.
41. PORTO ALEGRE. CEEE. Companhia Estadual de Energia Elétrica. **Serviços - CEEE - Simulador do valor da conta**. 2018. Disponível em: <<http://www.cee.com.br>>. Acesso em: 26 out. 2018.
42. PURANIK, V. et al. Effect of Different Drying Techniques on the Quality of Garlic: A Comparative Study. **American Journal of Food Technology**, v. 7, n. 5, p.311-319, 2012.
43. QU, C. et al. China's Soil Pollution Control: Choices and Challenges. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 24, p.13181-13183, 2016.
44. RAMEZANI, Z., AGHEL, N., AMIRABEDIN, N. Determination of Pb and Cd in Garlic Herb (*Allium sativum*) Planted in Gilan and Khuzestan Provinces Using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.** 2012:7(2); 41-4.

45. RESENDE, F. V.; DUSI, A. N.; MELO, W. F. Recomendações básicas para a produção de alho em pequenas propriedades (Comunicado técnico, 22). Brasília, DF: Embrapa-CNPq, 2004. 12p.
46. SATARUG, S.; MOORE, M. R. Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p.1099-1103, 2004.
47. SMOLDERS, E.; MERTENS, J. Cadmium. **Environmental Pollution**, p.283-311, 2012.
48. STANWAY, D. (Beijing). Scientific American. **16% of China's Soil Is Polluted**. 2014. Disponível em: <<https://www.scientificamerican.com/>>. Acesso em: 14 ago. 2018.
49. TANDON, S. K.; SINGH, S.; PRASAD, S. Influence of Garlic on the Disposition and Toxicity of Lead and Cadmium in the Rat. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 6, p. 450-454, 2001.
50. THE INTERNATIONAL CADMIUM ASSOCIATION (ICDA) (Org.). **Cadmium emissions**. Disponível em: <<https://www.cadmium.org/environment/>>. Acesso em: 7 ago. 2018.
51. TYLER, G. **ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared**. TECHNICAL NOTE 05. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/3a99/7ca1a20b00e68003ca04937b2035d0d76a5d.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2018.
52. USA. Environmental Protection Agency. United States Environmental Protection Agency. **Lead (Pb) Air Pollution**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/lead-air-pollution>>. Acesso em: 7 ago. 2018.
53. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ, 2012. 94 p.
54. WEILER, F. H. **Avaliação de Nova Metodologia para Determinação de Elementos-Traços em Carne de Ave**. 2013. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
55. XU, D. et al. Assessment of trace metal bioavailability in garden soils and health risks via consumption of vegetables in the vicinity of Tongling mining area, China. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 90, p.103-111, 2013.