

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

ESTUDO DE MODIFICADORES QUÍMICOS PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Cr e Fe EM AMOSTRAS DE
SUPLEMENTOS ALIMENTARES USANDO ANÁLISE DIRETA DE
SÓLIDOS E ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE
ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE
GRAFITE

THAIS DEWITTE MACIEL

Porto Alegre, janeiro de 2021

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

THAIS DEWITTE MACIEL

ESTUDO DE MODIFICADORES QUÍMICOS PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Cr e Fe EM AMOSTRAS DE
SUPLEMENTOS ALIMENTARES USANDO ANÁLISE DIRETA DE
SÓLIDOS E ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE
ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE
GRAFITE

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

Profa. Dra. Maria Goreti R. Vale
Orientadora

Porto Alegre, janeiro de 2021

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 03/2018 e 01/2021, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Maria Goreti Rodrigues Vale. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela banca examinadora.

*À minha mãe Sandra, ao meu pai Carlos
e à minha irmã Eduarda,
por todo o amor, apoio e incentivo,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Sandra, por todo o amor e ensinamentos e por sempre me incentivarem a perseguir os meus sonhos.

À minha irmã Eduarda, pela cumplicidade, parceria e apoio.

Ao Douglas, meu amor, por fazer dos meus sonhos os seus e escolher caminhar ao meu lado.

Aos meus avós, Neusa e Eduardo, por serem exemplos de força e amor e pelo apoio durante a minha vida inteira.

À Mica, por ser minha parceira inseparável.

À Profa. Dra. Maria Goreti, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação, apoio, amizade, incentivo e confiança ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Morgana Dessuy, pela amizade, conselhos, e por toda a contribuição que teve nesse trabalho.

Ao Dr. Wiliam Boschetti, pela amizade, discussões, sugestões, paciência, apoio e auxílio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas de laboratório: Leandro, Léo, Álvaro, Débora, Deninha, Mari, Susane, Xicó e Ingrid pelo companheirismo, amizade, discussões e momentos de descontração compartilhados. Também à Carol, Carla e Nati, principalmente pela amizade.

A todos os meus amigos que de alguma forma me incentivaram e me ajudaram ao longo deste período.

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

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão bibliográfica.....	4
3.1. Suplementos alimentares e regulamentação.....	4
3.2. Cromo e ferro.....	7
3.3. Determinação elementar em suplementos alimentares.....	8
3.4. Espectrometria de absorção atômica (AAS) e a análise direta de sólidos.....	15
3.5. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).....	19
4. Procedimentos experimentais.....	27
4.1. Instrumentação e condições experimentais.....	27
4.2. Reagentes.....	30
4.3. Amostras e material de referência certificado.....	31
4.4. Procedimento analítico.....	33
4.5. Parâmetros de mérito.....	33
4.5.1. Avaliação da exatidão.....	33
4.5.2. Avaliação da precisão.....	34
4.5.3. Limites de detecção e quantificação.....	34
4.5.4. Massa característica.....	35
5. Resultados e discussão.....	36
5.1. Estudos preliminares.....	36
5.2. Modificadores químicos para a determinação simultânea de Cr e Fe.....	38
5.2.1. $Mg(NO_3)_2$	39
5.2.2. $NH_4H_2PO_4$	41

5.2.3. $NH_4H_2PO_4$ e $Mg(NO_3)_2$	41
5.2.4. $Pd(NO_3)_2$ e $Mg(NO_3)_2$	42
5.2.5. $Pd(NO_3)_2$	43
5.2.6. H_2O_2	44
5.2.7. Ácidos inorgânicos.....	45
5.2.8. Estudo da concentração de modificador	51
5.3. Curvas de pirólise e atomização.....	56
5.4. Estudo da influência da massa de amostra.....	60
5.5. Parâmetros de mérito.....	62
5.6. Aplicação do método.....	66
6. Sugestão de estudos futuros.....	72
7. Conclusões.....	73
8. Referências.....	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Princípio da espectrometria de absorção atômica. A radiação incidente (P_0) é absorvida pelo analito (nuvem atômica) presente na amostra atomizada, resultando em um feixe transmitido de menor intensidade (P). (Fonte: adaptado de Skoog *et al.*²⁶).....15
- Figura 2.** Esquema dos componentes principais de um espectrômetro de absorção atômica. (Fonte: adaptado de Fick, 2018³⁵).....17
- Figura 3.** Esquema representando os principais componentes de um espectrômetro de HR-CS AAS. (Fonte: adaptado de Welz⁷).....20
- Figura 4.** Representação da avaliação de diferentes *pixels* no sinal analítico. (Fonte: adaptado de Heitmann *et al.*⁴³).....22
- Figura 5.** Espectros resolvidos no tempo para: **a)** solução padrão de 350 pg de Cr e 40 ng de Fe; **b)** amostra MV2 ($m_{MV2} = 0,816$ mg) e **c)** amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,190$ mg) obtidas na região das linhas analíticas de Cr (357,869 nm) e Fe (358,120 nm), na ausência de modificadores químicos *via* HR-CS GF AAS e análise direta de amostras sólidas. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C sem fluxo de Ar durante a etapa de atomização.....37
- Figura 6.** Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando **a)** 5,0 µg ($m_{MV1} = 0,071$ mg), **b)** 20 µg Mg ($m_{MV1} = 0,028$ mg) e **c)** 40 µg Mg ($m_{MV1} = 0,084$ mg) como modificador químico. $T_{pir} = 1100$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....40
- Figura 7.** Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,026$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 40 µg NH₄H₂PO₄ como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....41
- Figura 8.** Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,051$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 40 µg Mg + 40 µg NH₄H₂PO₄ como modificadores químicos. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....42

Figura 9. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando 10 µg Pd + 6,0 µg Mg ($m_{MV1} = 0,048$ mg) como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....**43**

Figura 10. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando 10 µg Pd ($m_{MV1} = 0,021$ mg) como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....**44**

Figura 11. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta, para a amostra MV1 usando 10 µL H₂O₂ 30% ($m_{MV1} = 0,087$ mg) como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....**45**

Figura 12. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,057$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 20 µL de HCl 1% como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....**46**

Figura 13. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,080$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 20 µL de HNO₃ 1% como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....**47**

Figura 14. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,042$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.....**48**

Figura 15. Perfis de pico para **a)** 350 pg Cr e **b)** 40 ng Fe com a adição de HCl (—), HNO₃ (—) e H₂SO₄ (—) 1% como modificadores químicos. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização....**49**

Figura 16. Perfis de pico para **a)** Cr e **b)** Fe para a amostra MV1 com a adição de HCl (—), HNO₃ (—) e H₂SO₄ (—) 1% como modificadores químicos. As massas de amostra pesadas para a adição de HCl, HNO₃ e H₂SO₄ foram,

respectivamente, 0,061 mg, 0,072 mg e 0,063 mg. $T_{pir} = 1300\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{atm} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização.....51

Figura 17. Estudo da influência da concentração de H_2SO_4 no sinal analítico de **a)** Cr e **b)** Fe para $10\text{ }\mu\text{L}$ da solução padrão com 750 pg Cr e 80 ng Fe (\circ) e para a amostra MV1 (\blacktriangleright). $T_{pir} = 1300^{\circ}\text{C}$ e $T_{atm} = 2600^{\circ}\text{C}$. Massas da amostra MV1 normalizadas para $0,05\text{ mg}$. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ($n = 3$ para solução padrão e $n = 5$ para amostra).....54

Figura 18. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando **a)** $20\text{ }\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }0,05\%$ ($m_{MV1} = 0,043\text{ mg}$) e **b)** $20\text{ }\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }1\%$ ($m_{MV1} = 0,068\text{ mg}$) como modificador químico. $T_{pir} = 1300\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{atm} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização.....55

Figura 19. Curvas de pirólise para **a)** Cr e **b)** Fe para a amostra MV1 (\blacktriangleright) e padrão com 750 pg Cr e 80 ng Fe (\circ) com $20\text{ }\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }1\%$ como modificador químico. A massa da amostra MV1 foi normalizada para $0,05\text{ mg}$. $T_{atm} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ($n = 3$ para solução padrão e $n = 5$ para amostra).....57

Figura 20. Curvas de atomização para **a)** Cr e **b)** Fe para a amostra MV1 (\blacktriangleright) e solução padrão com 750 pg Cr e 80 ng Fe (\circ) com $20\text{ }\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }1\%$ como modificador químico. A massa da amostra MV1 foi normalizada para $0,05\text{ mg}$. $T_{pir} = 1200\text{ }^{\circ}\text{C}$ e taxa de fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização ($n = 3$ para solução padrão e $n = 5$ para amostra).....59

Figura 21. Influência da massa de amostra para **a)** MV1 e **b)** MV2 no sinal analítico de Cr (\blacksquare) e Fe (Δ) com $20\text{ }\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }1\%$ como modificador químico. $T_{pir} = 1200\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{atm} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de limites mínimos e máximos de Cr e Fe que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo e por grupo populacional indicado pelo fabricante publicada pela ANVISA.....	8
Tabela 2. Programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação simultânea de Cr e Fe <i>via</i> HR-CS GF AAS utilizando a SS.....	28
Tabela 3. Condições instrumentais utilizadas durante a etapa de atomização e avaliação do sinal de Cr e Fe.....	28
Tabela 4. Amostras de suplementos alimentares avaliadas, com tipo de amostra, códigos, faixa etária recomendada, formas de comercialização e recomendação de consumo diário pelo fabricante.....	32
Tabela 5. Parâmetros de mérito obtidos para Cr e Fe utilizando duas diferentes condições experimentais <i>via</i> HR-CS GF AAS e a análise direta de amostras sólidas. 20 µL de H ₂ SO ₄ 1% como modificador químico. T _{pir} = 1200 °C e T _{atm} = 2600 °C.....	64
Tabela 6. Determinação de Cr e Fe no SRM NIST 8415 <i>Whole Egg Powder</i> por HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos para avaliação da exatidão do método proposto. Utilizando a condição 1 e 20 µL de H ₂ SO ₄ 1% como modificador químico. T _{pir} = 1200 °C e T _{atm} = 2600 °C. (Média ± desvio padrão, n = 5).....	66
Tabela 7. Concentrações de Cr e Fe apresentadas nos rótulos das amostras comercializadas, considerando os valores de tolerância (20% para mais ou para menos) permitidos pela RDC N° 360 (23 de dezembro de 2003) ¹⁸ e concentrações obtidas através da determinação de Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares por HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos. Resultados obtidos utilizando as duas condições experimentais do método e 20 µL de H ₂ SO ₄ 1% como modificador químico. T _{pir} = 1200 °C e T _{atm} = 2600 °C. (Média ± desvio padrão, n = 5).....	68
Tabela 8. Consumo máximo de Cr e Fe diário em cada amostra, obtido a partir das concentrações encontradas no presente trabalho e utilizando a recomendação máxima de consumo diário das amostras que cada fabricante recomenda.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS - Espectrometria de absorção atômica (*atomic absorption spectrometry*)
- A_{int} - Absorvância integrada
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CCD - Dispositivos de carga acoplada (*charge-coupled device*)
- CP - Pixel central (*center pixel*)
- CRC - Célula de Reação de Colisão (*collision reaction cell*)
- CRM - Material de referência certificado (*certified reference material*)
- FAAS - AAS com chama (*flame AAS*)
- GF AAS - AAS com forno de grafite (*graphite furnace AAS*)
- HR-CS - Alta resolução com fonte contínua (*high-resolution continuum source*)
- IN - Instrução Normativa
- ICP - Plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma*)
- LA - Ablação a laser (*laser ablation*)
- LOD - Limite de detecção (*limit of detection*)
- LOQ - Limite de quantificação (*limit of quantification*)
- LS - Fonte de linha (*line source*)
- LSBC - Correção de fundo por mínimos quadrados (*least-square background correction*)
- MS - Espectrometria de massa (*mass spectrometry*)
- m_0 - massa característica
- OES - Espectrometria de emissão óptica (*optical emission spectrometry*)
- P_0 - Radiação incidente
- P - Radiação transmitida
- R - Coeficiente de correlação
- RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
- RSD - Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)
- SD – desvio padrão (*standard deviation*)
- S/N - Sinal/ruído (*signal-to-noise*)
- SRM – Material de Referência Padrão (*standard reference material*)

SS - Análise direta de sólidos (*solid sampling*)

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

T - Transmitância

T_{atm} - Temperatura de atomização

T_{pir} - Temperatura de pirólise

RESUMO

Nesse trabalho, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS) com análise direta de sólidos foi empregada para a determinação simultânea de Cr e Fe em suplementos alimentares, amostras que apresentam matrizes complexas. Para as investigações, foram usadas a linha principal do Cr a 357,869 nm e a linha secundária do Fe a 358,120 nm. Durante o desenvolvimento do método, foram observados efeitos de matriz em algumas amostras, que não puderam ser contornados com otimizações no programa de temperatura. Assim, foi realizado um estudo de modificadores químicos (Pd, Mg e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Entretanto, eles não foram eficientes para contornar os problemas. Em seguida, foram testados os ácidos inorgânicos (HCl, HNO_3 e H_2SO_4) como modificadores, os quais resultaram em sinais analíticos simétricos e reprodutíveis para Cr e Fe. Após um estudo mais criterioso, H_2SO_4 1% (20 μL) foi escolhido como modificador químico por apresentar melhor desempenho. Devido à ampla faixa de concentração dos analitos nas amostras, foi explorada a possibilidade de uso de diferentes *pixels* para a avaliação do sinal analítico desses elementos, uma característica única da HR-CS GF AAS, bem como a presença ou ausência de fluxo de Ar na etapa de atomização. Assim, duas condições experimentais foram estabelecidas a fim de se obter maior flexibilidade nos parâmetros de mérito. As temperaturas de pirólise e atomização foram otimizadas para 1200 e 2600 °C, respectivamente. Para calibração, foram utilizadas soluções padrão aquosas. Após o estabelecimento dos parâmetros de mérito para as duas condições experimentais adotadas, foram avaliadas dez amostras de suplementos alimentares (4 fórmulas infantis e 6 multivitamínicos). Os LODs e LOQs encontrados foram, respectivamente, 7,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para Cr, e 2,1 mg kg^{-1} e 7,0 mg kg^{-1} , para Fe, na condição 1; e 4,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para Cr, e 0,65 mg kg^{-1} e 2,2 mg kg^{-1} para Fe, na condição 2. Os resultados obtidos para o CRM apresentaram-se de acordo com os valores certificados. As concentrações de Cr e Fe nas amostras variaram de 0,017 a 15,5 mg kg^{-1} e 34 a 38193 mg kg^{-1} , respectivamente. Finalmente, foi feita uma comparação com os valores dos

rótulos das embalagens de suplementos alimentares e com os limites diários, por idade, estabelecidos pela ANVISA.

Palavras-chave: Determinação simultânea, modificador químico, Cr, Fe, HR-CS GF AAS, suplementos alimentares.

ABSTRACT

In this work, high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS) with direct analysis of solids was used for the simultaneous determination of Cr and Fe in dietary supplements, samples that present complex matrices. The primary Cr resonance line at 357.869 nm and a secondary Fe line at 358.120 nm, were used in the investigation. During the method development, matrix effects were observed in some samples, which could not be solved with optimizations in the temperature program. Thus, a study of chemical modifiers (Pd, Mg and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) was carried out. However, they were not efficient to overcome the matrix effects. Then, inorganic acids (HCl, HNO_3 and H_2SO_4) were tested as chemical modifiers which resulted in symmetrical and reproducible analytical signals for Cr and Fe. After a more careful study, H_2SO_4 1% (20 μL) was chosen as the best chemical modifier because of its performance. Due to the wide range of analyte concentration in the samples, the possibility of using different pixels for the evaluation of the analytical signal of these elements was explored, a unique feature of HR-CS GF AAS, as well as the presence or absence of Ar flow in the atomization step. Thus, two experimental conditions were established to obtain better flexibility in the figures of merit. The pyrolysis and atomization temperatures were optimized to 1200 and 2600 °C, respectively. The calibration was carried out with aqueous standard solutions. After establishing the figures of merit for both experimental conditions adopted, ten samples of dietary supplements (4 infant formulas and 6 multivitamins) were evaluated. The LODs and LOQs found were, respectively, 7.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for Cr, and 2.1 mg kg^{-1} and 7.0 mg kg^{-1} , for Fe, for condition 1; and 4.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for Cr, and 0.65 mg kg^{-1} and 2.2 mg kg^{-1} for Fe, for condition 2. The results obtained for the CRM were in agreement with the certified values. The concentrations of Cr and Fe found ranged from 0.017 to 15.5 mg kg^{-1} and 34 to 38193 mg kg^{-1} , respectively. Finally, a comparison was made against the values of the labels on the packaging of dietary supplements and with the daily limits by age according to ANVISA.

Keywords: Simultaneous determination, chemical modifier, Cr, Fe, HR-CS GF AAS, dietary supplements.

1. Introdução

Com o objetivo de compensar a falta de nutrientes, aliada à um custo acessível e o fácil acesso, a procura por suplementos alimentares vem crescendo significativamente nos últimos anos.^{1,2} Infelizmente, muitas pessoas consomem suplementos alimentares por iniciativa própria e sem a devida recomendação de um profissional especializado.¹

Apesar do elevado consumo de suplementos alimentares no Brasil nos últimos anos, foi apenas em 2018 que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu regulamentações a respeito dos suplementos alimentares. A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 243³, de 26 de julho de 2018, em conjunto com a Instrução Normativa IN Nº 28⁴ de 26 de julho de 2018, atualizada no dia 5 de novembro de 2020 (IN nº 76⁵), estabelecem as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem para esses produtos. Nestes documentos constam os limites mínimos e máximos de minerais que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares, de acordo com o grupo populacional. Nesse contexto, merecem destaque dois elementos essenciais, que estão comumente presentes nos suplementos alimentares, objetos de estudo do presente trabalho: Cr e Fe.

Assim, considerando o elevado consumo de suplementos alimentares, somado à publicação de uma nova legislação, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de avaliar a conformidade desses produtos em relação aos limites estabelecidos.

Na literatura, estudos utilizam as técnicas de plasma para a análise desse tipo de amostra, sendo empregadas, principalmente, as técnicas de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS), também é amplamente citada, utilizando atomizadores de chama (F AAS) e forno de grafite (GF AAS).

A maioria dos métodos reportados para a análise de amostras sólidas requer uma prévia decomposição dessas através do uso de ácidos. Apesar desses métodos serem eficientes, existe o risco de ocorrência de erros sistemáticos por

contaminações ou perdas por volatilização de espécies do analito, com prejuízos para a precisão e exatidão dos resultados.⁶

Alternativamente, surge a análise direta de amostras sólidas (do inglês, *solid sampling* - SS), que permite a obtenção de informações sobre a composição elementar diretamente, sendo as amostras submetidas a um mínimo tratamento prévio.⁶ Com o desenvolvimento da técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS), é possível realizar a determinação simultânea de Cr e Fe utilizando a análise direta de amostras sólidas.^{7,8}

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método que minimize o tempo de análise, utilizando a análise direta de amostras sólidas através da técnica de HR-CS GF AAS para a verificação da conformidade de amostras de suplementos alimentares quanto aos recentes limites de Cr e Fe estabelecidos pela ANVISA bem como a comparação das concentrações obtidas com o rótulo das amostras.

2. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho consistiu no desenvolvimento um método rápido, confiável e sensível para a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares por SS em HR-CS GF AAS.

Esse trabalho teve como objetivos específicos:

1. Otimizar um método analítico para a determinação simultânea de Cr e Fe através da análise direta de sólidos com a técnica de HR-CS GF AAS;
2. Investigar a necessidade de uso de modificadores químicos e otimizar os parâmetros instrumentais como temperaturas de pirólise e de atomização;
3. Estabelecer os parâmetros de mérito tais como: a massa característica (m_0), o limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ), bem como avaliar a exatidão do método desenvolvido através da utilização de um material de referência certificado (CRM);
4. Quantificar Cr e Fe nas amostras escolhidas utilizando o método desenvolvido;
5. Comparar os resultados obtidos com os limites estabelecidos pela ANVISA e com os rótulos das amostras.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Suplementos alimentares e regulamentação

É sabido que uma dieta que inclua uma variedade adequada de alimentos deve fornecer todos os nutrientes necessários para um estado geral de saúde. Entretanto, em alguns casos, apenas os alimentos podem não fornecer quantidades suficientes de nutrientes específicos, especialmente quando as necessidades nutricionais mudam devido a doenças, envelhecimento, gravidez ou atividades físicas.⁹ Nesse contexto, o uso de suplementos alimentares surge como uma alternativa, com o objetivo de complementação da dieta.^{2,10}

Esses produtos são, geralmente, preparados através de síntese laboratorial ou a partir de produtos naturais que incluem diferentes partes de plantas e/ou óleo de peixe^{2,10}, sendo comercializados em diferentes formatos, como gel, pílulas, cápsulas, óleos e comprimidos.²

A procura por suplementos alimentares vem crescendo significativamente nos últimos anos.¹ De 2010 a 2016, por exemplo, o consumo desses produtos no Brasil cresceu em 233%, alcançando uma receita de mais de R\$ 1,49 bilhões em 2016. Muitos são os motivos para esse aumento, destacando-se a compensação da falta de nutrientes, aliada à um custo acessível e ao fácil acesso. Os suplementos alimentares são ainda utilizados na prevenção de doenças, uma vez que eles são comumente considerados remédios alternativos que não apresentariam possíveis efeitos colaterais.²

Apesar do elevado consumo de suplementos alimentares no Brasil nos últimos anos, até 2018 não existia na legislação sanitária brasileira uma regulamentação específica para essa categoria, fazendo com que os fabricantes e importadores precisassem considerar uma diversidade de normas de alimentos e de medicamentos para sua regularização no país. Além disso, as normativas aplicáveis ao mercado desses produtos apresentavam lacunas regulatórias, além de sobreposições entre categorias de produtos e requisitos desatualizados, ambíguos e desproporcionais ao nível de risco.¹¹

Foi apenas em 2018 que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu regulamentações a respeito dos suplementos

alimentares. Tal regulamentação visou reunir em uma única categoria de suplementos alimentares os produtos que até então estavam enquadrados em seis categorias de alimentos (suplementos de vitaminas e minerais, substâncias bioativas e probióticos, novos alimentos, alimentos com alegações de propriedades funcionais, suplementos para atletas e complementos alimentares para gestantes e nutrízes) e uma categoria de medicamento (medicamentos específicos sem prescrição médica).¹¹

Assim, a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 243, de 26 de julho de 2018³, dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares e para atualização das listas de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar desses produtos. A mesma resolução apresenta a definição de suplemento alimentar como sendo o “produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados”.³

De maneira complementar à RDC Nº 243/2018, foi publicada em conjunto a Instrução Normativa - IN nº 28, de 26 de julho de 2018⁴ que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Tal Instrução Normativa recebeu uma atualização no dia 5 de novembro de 2020, a IN nº 76⁵, que inclui alguns constituintes na “lista de constituintes autorizados para uso em suplementos alimentares indicados para lactentes (0 a 12 meses) ou crianças de primeira infância (1 a 3 anos)”. O Anexo III das referidas Instruções Normativas (IN nº 28 de 26 de julho de 2018 e IN nº 76 de 5 de novembro de 2020) define a lista de limites mínimos de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo.

Vale destacar, também, que o Anexo IV das referidas Instruções Normativas, define a lista dos limites máximos de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos que não podem ser ultrapassados pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo. Tais limites são divididos por grupo populacional, ou seja, variam de acordo com a faixa etária (0 a 6 meses, 7 a 11 meses, 1 a 3 anos, 4 a 8 anos, 9 a 18 anos, ≥ 19 anos), apresentando também categorias para gestantes e lactantes.⁴

Dentre os nutrientes que podem estar presentes nos suplementos alimentares, estão os minerais, que podem ser definidos como um grupo de substâncias essenciais para o funcionamento normal do metabolismo, crescimento e desenvolvimento, estrutura corporal, regulação das funções celulares e balanço eletrolítico dos fluidos corporais. Nessa linha, elementos como Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Cr, Mn, Zn e Se são considerados essenciais ao organismo, devido à sua importância fisiológica e papéis biológicos.^{12,13}

Para todos esses elementos, existe uma quantidade de ingestão adequada para o corpo e, por isso, são divididos em duas classes: macro minerais (Ca, Mg, K e Na) e micro minerais (Cr, Cu, Fe, Mn, Se, Zn).^{12,13,14,15} Entretanto, mesmo os elementos considerados essenciais podem, quando excedem uma determinada concentração, ser prejudiciais ou tóxicos.^{16,17}

Uma outra regulamentação que deve ser levada em consideração é a RDC Nº 360, de 23 de dezembro de 2003¹⁸, que define como deve ser realizada a rotulagem nutricional de alimentos embalados e estabelece que “na rotulagem nutricional devem ser declarados os seguintes nutrientes: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans e sódio”.¹⁸ Essa RDC é de extrema importância já que é através do rótulo que os consumidores, médicos e nutricionistas avaliam as informações nutricionais contidas nos produtos, para que possam verificar qual a melhor opção para as devidas necessidades individuais.

Por terem fácil acesso, como referido anteriormente, muitas pessoas consomem suplementos alimentares por iniciativa própria, sem a devida recomendação de profissionais especializados. A questão é ainda mais preocupante quando esses produtos são consumidos durante longos períodos. Não por acaso, essa situação tornou-se um problema de saúde pública, preocupando especialistas e autoridades, já que os consumidores muitas vezes não são capazes de avaliar os possíveis riscos para a saúde que esses produtos podem causar.¹

Neste contexto, dois elementos essenciais, comumente presentes nos suplementos alimentares, merecem destaque: Cr e Fe.

3.2. Cromo e ferro

O cromo é um dos nutrientes considerados essenciais e é necessário para o adequado metabolismo do açúcar e da gordura pelo organismo¹⁹, razão pela qual a ingestão insuficiente de Cr leva a sinais e sintomas semelhantes aos observados para diabetes e doenças cardiovasculares.¹⁹ Por esse motivo, esse metal é comumente encontrado na maioria dos suplementos alimentares.²⁰

Por outro lado, seu consumo descontrolado pode levar à intoxicação por Cr, a qual é caracterizada por alterações anatomopatológicas nos pulmões, rins e fígado. Além disso, estudos evidenciam que a exposição crônica a Cr pode causar o surgimento de células cancerosas, principalmente nos pulmões.^{21,22}

O ferro, por sua vez, é um micro mineral essencial que desempenha um papel significativo na produção e transporte de oxigênio para respiração celular. O ferro é fundamental para a produção de glóbulos vermelhos e para os processos redox. A falta de ferro pode causar cansaço incomum, falta de ar, diminuição do desempenho físico e problemas de aprendizagem em crianças e adultos, bem como aumentar o risco de infecções.^{20,23} Quando em excesso, entretanto, além de se tornar tóxico, pode elevar o risco de câncer e problemas cardiovasculares.²³ Além disso, o acúmulo de Fe no cérebro pode causar distúrbios neurológicos como Parkinson e Alzheimer.²⁴

Assim, considerando os riscos indicados, em especial a possibilidade de se tornarem tóxicos, a inspeção do conteúdo de minerais nos suplementos alimentares, devendo ser coerente com o estabelecido pela legislação, é de grande importância.^{4,25} Nessa linha, tendo em vista a nova legislação de suplementos alimentares publicada pela ANVISA, a qual apresenta os limites de Cr e Fe diários por faixa etária (Tabela 1)⁴, bem como o fato de que tais elementos, principalmente o Cr, são geralmente encontrados em baixas concentrações nos suplementos alimentares, torna-se necessário o uso de métodos analíticos com elevada sensibilidade para sua determinação.²⁵

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

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

Fonte: Adaptado de ANVISA.⁴

3.3. Determinação elementar em suplementos alimentares

Apesar da nova regulamentação, a ANVISA ainda não definiu - e nem mesmo recomenda - um método oficial para análise e determinação elementar em suplementos alimentares. Nesse contexto, diversas técnicas analíticas e procedimentos experimentais têm sido propostos nos últimos anos para a identificação e quantificação elementar nesses produtos.

As principais técnicas analíticas para determinação de minerais em suplementos alimentares são a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e chama (HR-CS F AAS) e a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS).

O princípio da técnica multi-elementar de ICP OES se baseia na detecção da radiação (fótons) emitida pelos átomos ou íons excitados pelo plasma, ao

retornarem ao seu estado fundamental. O sistema de introdução de amostra se baseia em um nebulizador, para produzir um aerossol que é conduzido pelo gás de arraste (Ar) até o plasma, onde ocorrem os processos de dessolvatação, vaporização, dissociação, atomização, excitação e ionização.^{26,27}

Na técnica de ICP-MS, íons formados no plasma são introduzidos no analisador de massas, onde são selecionados de acordo com sua razão massa-carga e, então, detectados. Como principais vantagens das técnicas de plasma podem ser destacadas a análise multi-elementar simultânea e a elevada sensibilidade, sendo essa última maior para a técnica de ICP-MS.²⁶

Já no que diz respeito às desvantagens das técnicas que utilizam o plasma como atomizador / fonte de excitação, estão a relativa intolerância a matrizes complexas (a presença de sólidos dissolvidos e/ou compostos orgânicos) e a necessidade de se ter amostras no estado líquido, o que pode resultar na adição de uma etapa de preparo de amostra ao tempo de análise. Além disso, essa última desvantagem pode exigir diluições, principalmente se a amostra for sólida, o que, eventualmente, poderá comprometer a precisão e os limites de detecção da análise.²⁷

Além das já mencionadas, outra importante desvantagem para essas técnicas consiste na necessidade de se estabelecer uma condição compromisso para todos os analitos, de forma que todos sejam detectados. Isso significa dizer que nem sempre será utilizada a melhor condição (condição ótima) para a determinação de cada analito.²⁷

Considerando os apontamentos realizados, serão discutidos, na sequência, trabalhos reportados nas últimas duas décadas referentes a determinação de Cr e/ou Fe em suplementos alimentares utilizando técnicas com plasma.

Soltyc *et al.*²⁵ (2003) determinaram Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, P, Se e Zn em preparações multiminerais e multivitamínicas e em matéria-prima farmacêutica através da técnica de ICP-MS. Para as análises, as amostras foram digeridas em micro-ondas com a adição de ácido nítrico (HNO₃) e, após a digestão, avolumadas com água ultrapura e diluídas sucessivamente até concentrações elementares possíveis de serem analisadas. Os autores relataram que, mesmo após a dissolução de matrizes complexas no micro-ondas, traços de carbono poderiam permanecer.

No estudo, foi observado o efeito de resíduos de carbono nas amostras digeridas apenas no caso da determinação de Cr. Os átomos de ^{12}C e ^{13}C originários da matriz formam íons ArC^+ com o argônio presente no plasma, interferindo nos isótopos de ^{52}Cr e ^{53}Cr , podendo ocasionar resultados falso positivos.

Então, diluições consecutivas foram realizadas nas amostras mineralizadas e a análise dos espectros de massa obtidos das soluções assim preparadas permitiu concluir que a razão $^{53}\text{Cr} / ^{52}\text{Cr}$ foi consistente com o valor calculado para a abundância natural desses isótopos, indicando que não havia interferências influenciando os resultados. Para uma das amostras, entretanto, não foi possível remover a interferência de C apenas com o uso de diluições. Para a correção dessa interferência, um fator de correção foi usado e, assim, foi realizada a determinação de Cr para a referida amostra.

Zachariadis *et al.*²⁸ (2008) utilizaram a técnica de ICP OES para a determinação de Ca, Mg, Mn, Fe, Cr, Al, Ag, B, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Ga, In, Ni, Pb, Zn e As em preparações multivitamínicas e multiminerais. As amostras foram transformadas em suspensões com a adição de HNO_3 e água ultrapura. Também foi realizada digestão ácida em bloco de alumínio com a adição de HNO_3 para verificar se o preparo de amostras em suspensão era eficaz. Os autores comentam que, durante a aspiração das suspensões para análise, foi necessária agitação constante nos frascos, já que um precipitado se formava quando a suspensão ficava parada, comprometendo a homogeneidade da amostra. Não foi evidenciada a presença de interferentes nas análises realizadas.

Avula *et al.*²⁹ (2011) analisaram trinta e cinco diferentes suplementos multivitamínicos e multiminerais por Célula de Reação de Colisão (CRC) ICP-MS para determinar Na, Mg, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Hg e Pb. As amostras (sólidas e líquidas) foram submetidas à digestão por micro-ondas utilizando uma mistura de HNO_3 concentrado e ácido clorídrico (HCl) em uma proporção 8:2, respectivamente. Após a digestão, as amostras foram diluídas conforme necessidade com água ultrapura. Foram variadas as composições de gases na análise com o objetivo de eliminar possíveis interferências espectrais resultantes das matrizes, razão pela qual, não foi necessário utilizar fator de correção.

Krejčová *et al.*³⁰ (2012) desenvolveram métodos de ICP-MS e ICP OES para determinação elementar em preparações multivitamínicas e suplementos dietéticos. As amostras comercializadas em comprimidos foram moídas e homogeneizadas enquanto as amostras comercializadas em cápsulas foram abertas e o conteúdo utilizado para a análise. O método de ICP OES foi utilizado para a determinação dos macro elementos (Na, K, Ca, Mg e P) e de alguns micro elementos (Cu, Fe, Mn, Zn, Cr, Ni e V) e a técnica de ICP-MS foi utilizada para a determinação de outros vinte e seis elementos.

Para a realização da digestão ácida das amostras em micro-ondas, foi empregado HNO₃ em uma mistura com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou ácido fluorídrico (HF) (esse último utilizado quando as amostras continham sílica). As amostras, quando necessário, foram diluídas com água ultrapura. No caso da análise por ICP OES, não foram detectadas interferências espectrais. As interferências não espectrais deriváveis de agentes de decomposição (especialmente uma concentração de ácidos mais alta) foram superadas usando *matrix-matching*.

Marrero *et al.*²⁰ (2013) determinaram As, Bi, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, V e Zn em cinco amostras de suplementos alimentares comercializadas na forma de comprimidos por ICP OES. As amostras foram moídas e homogeneizadas e em seguida digeridas em micro-ondas utilizando HNO₃ e H₂O₂. Após o resfriamento, as amostras digeridas foram evaporadas lentamente até quase a secura e então dissolvidas e avolumadas em água ultrapura. Os autores não reportaram interferentes nas análises.

Bu *et al.*¹⁷ (2013) determinaram as concentrações de Mg, Al, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn e Cd em seis suplementos de ervas pela técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e ablação a laser (LA-ICP-MS), com o objetivo de evitar o preparo de amostras envolvendo digestões. A partir das amostras, foram preparadas pastilhas de 2 a 4 mm através do uso de uma prensa. Apesar da preparação ser relativamente fácil e rápida na LA-ICP-MS, existe uma dificuldade de encontrar padrões para a calibração com composições semelhantes às amostras para contornar o efeito de matriz. Assim, geralmente utiliza-se um material de referência certificado (do inglês *Certified Reference Material* – CRM) para esse fim, o que incrementa custo ao método. No estudo de Bu e colaboradores, foi utilizada uma substância

de referência certificada (do inglês *Standard Reference Material* - SRM) de folha de tomate como padrão de calibração, sendo empregada também na forma de pastilha.

As amostras também passaram por um processo de digestão em micro-ondas com HNO₃, H₂O₂ e HF, para fins de comparação. No geral, os autores reportaram que os resultados mostraram que o método é adequado como uma forma rápida de avaliar os níveis de metais em cápsulas de suplementos de ervas sem digestão ácida. Os autores não reportaram interferências durante o estudo.

Udousoro *et al.*³¹ (2017) determinaram a concentração de As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sn, V, e Zn em dezoito suplementos alimentares amplamente comercializados na Nigéria. A concentração dos elementos As, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mo, Na, P, Sn, e Zn foi determinada através da técnica ICP OES. O preparo das amostras para a análise com essa técnica consistiu em digestão ácida em micro-ondas utilizando HNO₃ e H₂O₂. Após a digestão, as amostras foram diluídas com água ultrapura.

Já os elementos Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e V foram determinados utilizando a técnica ICP-MS. Para essa análise, as amostras foram digeridas utilizando apenas HNO₃ e posteriormente diluídas com água ultrapura. Os autores não reportaram problemas com interferentes nas análises.

Outra técnica analítica comumente utilizada para determinação elementar em suplementos alimentares é a AAS, que será descrita na próxima Seção. Dentre os atomizadores reportados na literatura para tais análises estão a chama (FAAS) e o forno de grafite (GF AAS).

A seguir, serão apresentados trabalhos que utilizaram essa técnica para a determinações elementares de Cr e/ou Fe em matrizes semelhantes aos suplementos alimentares.

Conforme descrito anteriormente, Soltyc *et al.*²⁵ (2003) conseguiram contornar as interferências de C na análise dos isótopos de Cr para a maioria das amostras, sendo possível sua determinação por ICP-MS. Entretanto, para uma das amostras isso não foi possível e, para obter resultados confiáveis, foi aplicado um fator de correção para essa amostra. Com o objetivo de verificar se esse resultado estava correto, Cr foi quantificado também pela técnica de GF AAS, utilizando 600 e 2400 °C como temperaturas de pirólise e atomização,

respectivamente e a linha analítica de 357,9 nm. O preparo das amostras foi o mesmo tanto para a análise utilizando ICP-MS quanto para a análise utilizando GF AAS.

A partir dessa análise, foi verificado que os resultados foram concordantes. Além de Cr, também foram determinados Fe e Ca por GF AAS usando as linhas 248,3 e 422,7 nm, respectivamente. As temperaturas de pirólise e atomização utilizadas para Fe foram de 500 e 2300 °C e para Ca de 700 e 2400°C, respectivamente. Para a determinação desses elementos por GF AAS não foi descrito o uso de modificadores químicos e problemas relacionados a interferentes da matriz não foram reportados.

Soriano *et al.*¹² (2007) desenvolveram um método para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de comprimidos multivitamínicos e multiminerais por F AAS. Para a análise, foram testados dois métodos de extração, sendo que em um deles foi adicionado HCl e a solução foi mantida sob agitação por cinco minutos. O segundo método consistiu no mesmo procedimento, porém com adição de uma etapa em que as soluções permaneceram 12 horas em repouso. Os métodos de extração foram comparados com uma digestão ácida em micro-ondas, com adição de HNO₃. Os autores não reportaram interferentes durante as análises.

Tumir *et al.*³² (2010) determinaram Pb, Cd, Cr, Ni e Zn em trinta amostras de suplementos alimentares, comercializados nos mercados da Croácia utilizando a técnica de GF AAS para os quatro primeiros elementos e F AAS para Zn. As amostras foram submetidas a um processo de digestão por micro-ondas com a adição de HNO₃ e H₂O₂ e, após a digestão, foram diluídas com água ultrapura. Os comprimentos de onda utilizados foram 217,0 nm (Pb), 228,8 nm (Cd), 232,0 nm (Ni), 357,9 nm (Cr) e 213,9 nm (Zn). Os autores não relatam o uso de modificadores químicos no estudo e não reportam a presença de interferências.

É possível observar que, para a maioria dos trabalhos descritos anteriormente^{20,25,29-32}, diferentes tipos de ácidos são empregados, sendo a digestão assistida por micro-ondas o procedimento de preparo de amostra mais utilizado. Apesar dos métodos de digestão ácida serem muito comuns, existe o risco de ocorrência de erros sistemáticos por contaminações ou perdas por volatilização de espécies do analito, com prejuízos para a precisão e exatidão dos resultados. Nesse contexto, torna-se atraente a análise direta de amostras

sólidas (SS), que possibilita a obtenção de informações sobre a composição elementar diretamente, com as amostras sofrendo apenas um mínimo tratamento prévio.⁶

A SS (ou na forma de suspensão) apresenta vantagens significativas quando comparada aos métodos convencionais de digestão. Dentre elas estão (1) um pré-tratamento das amostras mais simples e rápido, (2) menores riscos de contaminações das amostras, já que evita o uso de reagentes para dissolução além de diminuir o número de etapas e, conseqüentemente, a manipulação das amostras, (3) menores perdas de analito (por volatilização ou adsorção), (4) menor periculosidade para o analista, já que não requer reagentes tóxicos ou corrosivos, (5) menor geração de resíduos, (6) maior detectabilidade do analito, uma vez que as amostras não precisam ser diluídas e (7) possibilidade de se analisar uma pequena quantidade de amostra (em alguns casos na ordem de poucos miligramas).⁶

Conforme descrito por Zachariadis *et al.*²⁸ e Soriano *et al.*¹², o preparo de suspensões também envolve o uso de ácidos. Entretanto, eles são geralmente diluídos e o procedimento realizado normalmente ocorre à temperatura ambiente, o que é considerado uma vantagem em relação à digestão ácida. Para o preparo das suspensões, contudo, as amostras ainda precisam ser diluídas, aumentando a possibilidade de contaminações e comprometendo a precisão e os limites de detecção do método. Além disso, um cuidado que deve ser tomado ao se analisar amostras na forma de suspensão é para que se mantenham estáveis e homogêneas durante a análise⁶, problema descrito por Zachariadis *et al.*²⁸

Nesse contexto, com foco na análise elementar, algumas técnicas podem fornecer informações quantitativas diretamente de uma amostra sólida, como LA-ICP-MS e GF AAS.

Dentre as técnicas que permitem a SS, destaca-se a GF AAS, que permite a análise de todos os tipos de amostras com um mínimo preparo, além de apresentar alta sensibilidade. Outra importante característica dessa técnica é a possibilidade de calibração utilizando soluções padrão aquosas, o que é muito incomum nas técnicas que empregam a análise direta de sólidos.⁸

Apesar dessas vantagens, a técnica apresenta limitações, geralmente associadas a interferências espectrais causadas pela matriz da amostra, que

não podem ser corrigidas adequadamente pela instrumentação clássica de fonte de linha (do inglês *line source* - LS AAS).³³ A introdução da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) trouxe a possibilidade de visualização da região espectral da linha analítica, em contraste à convencional LS AAS, fornecendo mais informações e, conseqüentemente, permitindo um maior controle sobre tais interferências, além de possibilitar a determinação de mais de um elemento simultaneamente, assuntos que serão abordados nas próximas Seções.⁸

3.4. Espectrometria de absorção atômica (AAS) e a análise direta de sólidos

O princípio da técnica se baseia no fenômeno de absorção de radiação de frequência específica por átomos livres (estado gasoso) para medir a concentração de analito em uma dada amostra.^{27,34}

Assim, parte da radiação incidente (P_0) é atenuada pela presença do analito (nuvem de átomos) no atomizador, resultando em uma menor intensidade de radiação transmitida (P) que chegará ao detector, conforme apresentado na Figura 1. Essa atenuação da radiação ocorre devido à transferência de energia para o átomo, promovendo sua transição do estado de menor energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado).^{27,34}

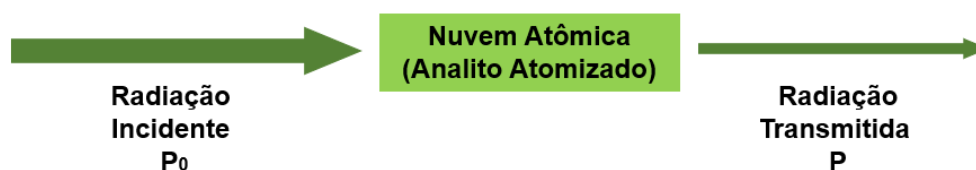


Figura 1. Princípio da espectrometria de absorção atômica. A radiação incidente (P_0) é absorvida pelo analito (nuvem atômica) presente na amostra atomizada, resultando em um feixe transmitido de menor intensidade (P). (Fonte: adaptado de Skoog *et al.*²⁴).

Através da razão entre a intensidade do feixe de radiação transmitido após ter passado pelo analito atomizado (P) e a intensidade inicial desse feixe incidido sobre essa (P_0), é obtida a transmitância (T) (Equação 1).

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Eq. (1)}$$

A Lei de Lambert-Beer relaciona a atenuação da radiação e a quantidade de analito presente na amostra, através da função logarítmica do inverso da transmitância, denominada absorvância, a qual possui uma relação linear com a concentração de analito da amostra (Equação 2).

$$A = \log_{10} 1/T = \epsilon bc \quad \text{Eq. (2)}$$

Sendo “A” a absorvância, que é dada pelo logaritmo do inverso da transmitância (T); e/ou igual à multiplicação entre a absorvidade molar “ ϵ ”, o comprimento do caminho óptico “b” e a concentração do analito “c”.

As fontes de radiação mais utilizadas são as lâmpadas de cátodo oco (HCL), também chamadas de fontes de linha, que, como o próprio nome sugere, consistem em lâmpadas especialmente desenvolvidas para emitir radiação com comprimentos de onda específicos para cada elemento, o que torna a técnica altamente seletiva e dispensa o uso de monocromadores de alta resolução. Assim, a técnica é conhecida como espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS).³⁴

A linha analítica é separada das outras linhas espectrais emitidas pela lâmpada através de um monocromador, que é constituído de uma fenda de entrada, de um elemento de dispersão (normalmente uma rede de difração), de espelhos para promover a reflexão da radiação e de uma fenda de saída ou fenda geométrica. Após passar pelo monocromador, a radiação chega ao detector, normalmente um tubo fotomultiplicador, no qual é convertida em sinal elétrico, que é amplificado e convertido para fornecer a absorvância.^{27,34}

Na Figura 2, está representada a configuração típica de um espectrômetro de absorção atômica com fonte de linha de forma esquemática. Nesta figura, estão presentes os componentes principais de um espectrômetro de AAS, sendo eles: fonte de radiação, atomizador, monocromador (responsável por garantir que apenas a radiação de interesse chegue ao detector) e detector.

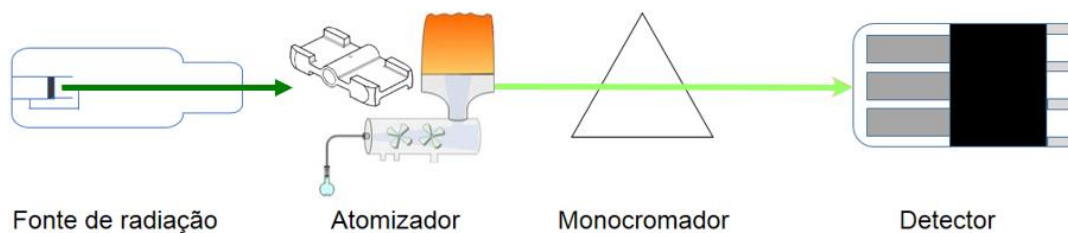


Figura 2. Esquema dos componentes principais de um espectrômetro de absorção atômica. (Fonte: adaptado de Fick, 2018³⁵).

A atomização é o processo mais importante em uma análise por AAS. Essa etapa consiste na transformação do analito em átomos livres no estado gasoso. Para a técnica de AAS, estão disponíveis, comercialmente, três tipos de atomizadores: chama, forno de grafite e tubo de quartzo.

O desenvolvimento da espectrometria de absorção atômica como técnica analítica ocorreu mediante os estudos de Alan Walsh, a partir de 1955, sendo inicialmente empregado um atomizador de chama (F AAS) no desenvolvimento dos primeiros espectrômetros de absorção atômica.

Devido à sua simplicidade, a técnica de F AAS é uma das técnicas mais utilizadas na determinação elementar. Contudo, ela apresenta elevados limites de detecção, se comparada com a GF AAS, e problemas de interferência de matriz, o que leva a combinação da técnica com algum procedimento de preparo de amostra.

A técnica de GF AAS foi desenvolvida por L'vov em 1959.³⁴ Para a análise em forno de grafite, a amostra, na forma sólida ou líquida, é dispensada dentro do forno e a temperatura é aumentada gradativamente para remover, tanto quanto possível, o solvente e os concomitantes, antes da etapa de atomização ser alcançada.³⁴ Uma vez que toda a alíquota de amostra, introduzida no forno, é vaporizada em um curto intervalo de tempo, é gerado um sinal em forma de pico em função do tempo.

Apesar do desenvolvimento da GF AAS, até meados de 1980 a técnica ainda apresentava algumas dificuldades, uma vez que os fornos não apresentavam comportamentos isotérmicos, seja temporal e/ou espacialmente. Um importante marco para a evolução da GF AAS ocorreu em 1981, quando Slavin, baseado nas observações de L'vov, propôs o conceito de Forno-Plataforma de

Temperatura Estabilizada (do inglês, *Stabilized Temperature Platform Furnace - STPF*).³⁴

O conceito STPF estabelece parâmetros para que a análise em GF AAS ocorra com o menor número de interferências possível, tornando-a altamente sensível, versátil e confiável para a determinação de elementos traço e ultra traço em uma ampla variedade de amostras.³⁴ Dentre as condições STPF estão:

- a) Atomização do analito a partir de uma plataforma e não da parede do forno;
- b) Uso de fornos de grafite piroliticamente recobertos;
- c) Medida de absorvância integrada;
- d) Uso de forno aquecido transversalmente;
- e) Aquecimento rápido durante a atomização;
- f) Uso de modificador químico.

Na GF AAS, é utilizado um programa de temperatura com o objetivo de separar o analito da matriz antes da etapa de atomização. Programas de temperatura típicos do forno de grafite incluem etapas de secagem, pirólise, atomização e limpeza do forno. A primeira etapa consiste na evaporação dos solventes presentes na amostra, seguida da etapa de pirólise, que tem como objetivo a eliminação da matriz, sem que ocorra a atomização do analito. Na sequência, ocorre a atomização, etapa na qual os analitos são volatilizados. Por fim, a etapa de limpeza tem como objetivo eliminar qualquer resquício de analito que possa ter permanecido no forno de grafite.⁷

Para garantir que o analito seja separado da matriz antes da etapa de atomização, é necessário utilizar a temperatura de pirólise mais alta possível. No entanto, como o analito não deve ser volatilizado durante a etapa de pirólise, existem limitações para a temperatura máxima.

Dessa forma, uma alternativa contida nas condições STPF é fazer uso de modificadores químicos, que têm como objetivo tornar as propriedades químicas e físicas do analito nos padrões de calibração e nas amostras o mais próximas possível. Assim, um reagente (modificador) é adicionado em alta concentração para alinhar as propriedades físicas e químicas das soluções e/ou amostras. O reagente, frequentemente, serve para converter o analito em uma forma menos volátil, de modo que temperaturas de pirólise mais altas possam ser aplicadas, favorecendo a eliminação da matriz. Alternativamente, o modificador químico

também pode converter os concomitantes em uma forma mais volátil, para que sejam eliminados com mais facilidade, minimizando interferências espectrais e não espectrais. Qualquer uma das medidas pode ser adequada para obter uma separação mais eficaz do analito dos concomitantes durante a etapa de pirólise.³⁴

Um exemplo de modificador químico é a mistura de nitratos de paládio e magnésio (Pd-Mg), proposta por Schlemmer e Welz.³⁶ Essa mistura é conhecida como modificador universal.

A técnica de GF AAS tem sido bastante empregada na determinação de metais em diversos tipos de matrizes devido a sua alta sensibilidade, por permitir o emprego de amostras com matrizes complexas e por possibilitar, em muitos casos, a calibração com padrões aquosos.³⁴ Além disso, como comentado anteriormente, permite a análise direta de amostras sólidas, dispensando etapas de pré-tratamento da amostra como a dissolução ou a decomposição, reduzindo consideravelmente o tempo de análise e a possibilidade de contaminações.⁶

Apesar de suas vantagens, a técnica de LS AAS apresenta algumas limitações, tipicamente associadas a interferências espectrais causadas pela matriz da amostra, que não podem ser corrigidas apropriadamente pela instrumentação clássica de fonte de linhas.³³ Além disso, uma das limitações mais sérias da técnica é a sua determinação monoelementar, derivada do uso de lâmpadas de cátodo oco individuais para cada elemento.⁷

A partir do fim da década de 80, houve uma estagnação no desenvolvimento instrumental, em relação a novas descobertas e aplicações da AAS.³⁷ Nesse período, Hieftje questionou o futuro da AAS, caso nenhuma inovação tecnológica fosse desenvolvida. Além disso, o autor sugeriu que os novos conceitos deveriam envolver a aplicação de uma fonte contínua, de monocromadores com maior resolução e de detectores com maior capacidade de processamento.³⁸

3.5. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS)

A HR-CS AAS constitui uma redefinição da AAS convencional, sendo uma ferramenta extremamente útil na análise elementar em diversos tipos de amostras, incluindo aquelas com matrizes complexas.⁷ Aprimorar a técnica de

AAS e contornar algumas desvantagens, como a necessidade do uso de uma lâmpada de cátodo oco para cada elemento e corrigir algumas interferências difíceis de serem eliminadas pelos métodos de correção tradicionais, foram a força motriz para o avanço e desenvolvimento dessa renomada técnica analítica.

Até meados de 1990, os estudos voltados para a solução desses problemas utilizavam componentes disponíveis comercialmente que foram projetados para outros fins, como a espectroscopia de emissão e, portanto, não idealmente adequados para a espectrometria de absorção atômica com fonte contínua (CS AAS).³⁹ O avanço na técnica aconteceu em 1996, quando o grupo de Becker-Ross projetou e construiu o primeiro protótipo do espectrômetro que originaria a técnica HR-CS AAS. Tal construção só foi possível graças à otimização e desenvolvimento de componentes específicos para a técnica.⁴⁰

O primeiro equipamento comercial foi introduzido no mercado somente em 2004, sendo empregada a chama como atomizador.⁷ A Figura 3 apresenta o esquema dos componentes de um espectrômetro de HR-CS AAS.

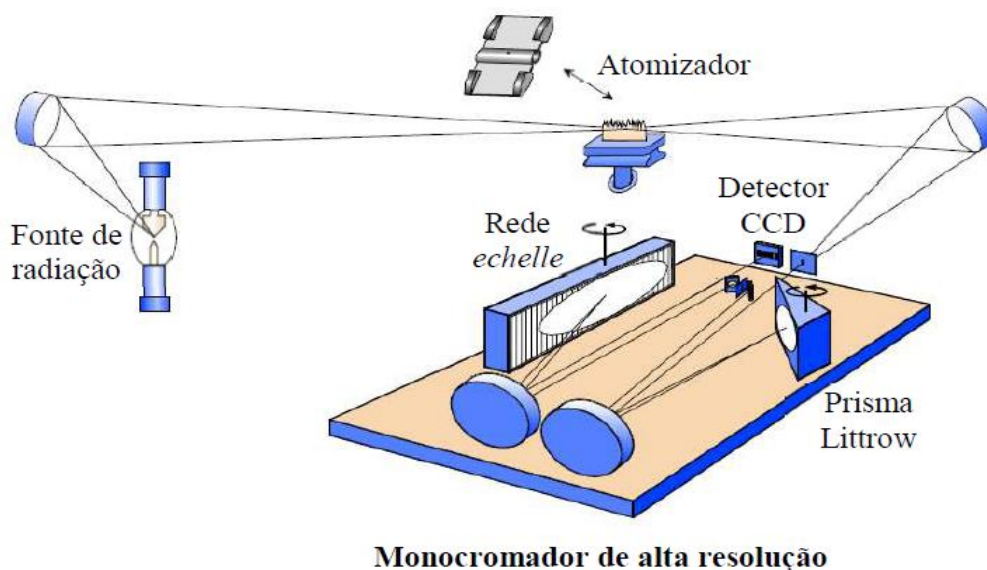


Figura 3. Esquema representando os principais componentes de um espectrômetro de HR-CS AAS. (Fonte: adaptado de Welz⁷).

O espectrômetro é composto por uma fonte de radiação contínua que, em contraste com uma fonte de linha, gera um espectro com uma distribuição espectral contínua em uma ampla faixa de comprimentos de onda. Também inclui um monocromador duplo de alta resolução com um prisma (pré-

monocromador), um monocromador grade de difração *echelle* de alta resolução e um detector de matriz de dispositivo de carga acoplada (CCD). Os sistemas de atomização são os mesmos utilizados na LS AAS, sendo os mais comuns a chama e o forno de grafite.³⁹

A fonte de radiação de alta intensidade consiste em uma lâmpada de arco curto de xenônio sob alta pressão, que emite comprimentos de onda em uma faixa contínua de 190 a 900 nm e opera em modo *hot spot* (modo caracterizado por um ponto de plasma extremamente concentrado próximo à superfície do cátodo de tungstênio).⁴¹ A lâmpada é operada a uma potência de 300 W e sua intensidade de emissão excede a de uma lâmpada de cátodo oco em, aproximadamente, duas ordens de grandeza.³⁹

O monocromador duplo de alta resolução é composto por um prisma *Littrow* e uma rede de difração *echelle*. O prisma realiza a pré-dispersão da radiação contínua e, assim, apenas a faixa pré-dispersa é direcionada à rede *echelle*, que a dispersa novamente.³⁹

O detector é constituído por dispositivos de carga acoplada (CCD) combinados em um arranjo linear. Cada região fotossensível do CCD (denominada como *pixel*) atua como um detector independente. Sua superfície de detecção é composta por 558 *pixels*, dos quais 200 são aplicados para fins analíticos e o restante é usado para correções internas.⁸

Assim, com o desenvolvimento da HR-CS AAS, os sinais analíticos são gerados com uma nova dimensão, o comprimento de onda. Logo, obtém-se um espectro tridimensional, no qual a dimensão do comprimento de onda é adicionada às dimensões tradicionais de absorvância e tempo, tornando possível a observação, com detalhes, da região da linha analítica de interesse.

Esse novo recurso permite a observação e correção de interferências espectrais, o que não era possível com o uso da LS AAS, que possui capacidade limitada de correção de fundo. Para isso, o espectrômetro possui um sistema para correção de fundo por um algoritmo de mínimos quadrados (do inglês, *least-square background correction* - LSBC). Esse algoritmo baseia-se na obtenção de um espectro de referência para o interferente, sendo possível subtraí-lo do intervalo espectral avaliado, restando apenas o sinal analítico do elemento investigado.^{7,42}

Além dessa importante otimização, Heitmann *et al.*⁴³ exploraram a detecção provida pelo CCD como meio para aumentar ou reduzir a sensibilidade analítica, dependendo do número de *pixels* avaliados (mais *pixels* = maior sensibilidade). Nesse contexto, na HR-CS AAS, cada parte da linha de absorção (área do pico) é medida por um *pixel* individual do detector.⁴² Assim, diferentes variações no número de *pixels* podem ser utilizadas para avaliar o sinal analítico.

Uma combinação comumente utilizada para monitorar o sinal analítico é o uso de 3 *pixels*, CP \pm 1, CP = *pixel* central e \pm 1 correspondem aos próximos *pixels* a esquerda e a direita de CP.^{8,43} Por outro lado, como as asas do pico (*pixels* laterais sem considerar o *pixel* central) também correspondem à absorção do elemento, esses *pixels* adjacentes podem ser empregados para redução da sensibilidade analítica, permitindo a determinação de elevadas concentrações de analito e o aumento da faixa linear de trabalho (Figura 4).⁷

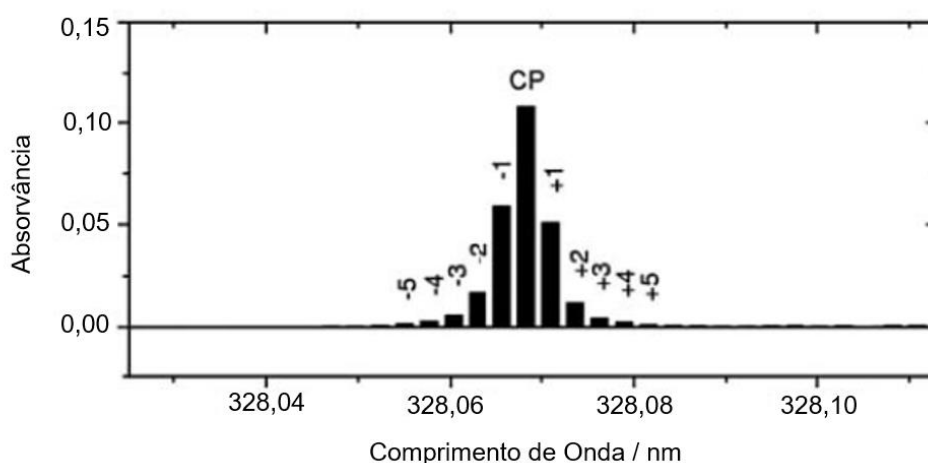


Figura 4. Representação da avaliação de diferentes *pixels* no sinal analítico. (Fonte: adaptado de Heitmann *et al.*⁴³).

Uma das principais razões que motivaram as pesquisas em CS AAS foi a expectativa de superar a limitação de determinar um elemento de cada vez, principalmente em GF AAS, onde os tempos de medição típicos são da ordem de alguns minutos.³⁹ Nesse contexto, o uso de linhas atômicas menos sensíveis tem sido fundamental para o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação simultânea de dois ou mais elementos por HR-CS GF AAS, já que é necessário que a linha do segundo analito esteja compreendida no mesmo intervalo espectral da linha do primeiro analito.^{7,44,45}

O uso de uma fonte de radiação contínua de alta intensidade na HR-CS GF AAS proporciona uma intensidade essencialmente igual em todos os comprimentos de onda, resultando na mesma relação sinal-ruído (S/N) melhorada para todas as linhas analíticas.^{7,42,46} Essa é uma importante característica para a determinação simultânea, já que uma das linhas analíticas utilizadas é quase inevitavelmente uma linha diferente da linha principal e, conseqüentemente, menos sensível, comparando-se com a linha secundária utilizando a técnica de LS AAS.

Assim, a técnica possibilita a determinação de dois ou mais elementos simultaneamente, contanto que suas linhas de absorção estejam dentro do intervalo espectral coberto pelo detector. No entanto, esse potencial é limitado pela estreita região espectral (de 0,2 a 1,0 nm, dependendo do comprimento de onda) que pode ser monitorada com a instrumentação comercialmente disponível. Além disso, ressalta-se que para realizar uma análise simultânea, a sensibilidade das linhas analíticas empregadas deve ser compatível com a concentração dos analitos presentes na amostra.

Além das condições citadas, é recomendado que os elementos em estudo apresentem comportamentos térmicos semelhantes, para que um único programa de temperatura seja estabelecido.^{8,42,44,45}

A técnica permite, também, determinar sequencialmente os analitos, empregando condições otimizadas para cada um independentemente, sendo necessária a troca da linha analítica entre os ciclos de atomização.⁸

A seguir, serão apresentados trabalhos que realizam determinações de Cr e/ou Fe através da técnica de HR-CS GF AAS em amostras com matrizes semelhantes àquela analisada no presente trabalho. Nesses estudos, são abordadas as possibilidades da técnica e, em alguns deles, a SS.

Virgilio *et al.*⁴⁷ (2012) empregaram a análise direta de sólidos para determinar Cr em amostras de plantas medicinais através da técnica de HR-CS GF AAS utilizando soluções padrão aquosas para a calibração. O preparo das amostras consistiu apenas na secagem dessas em um forno a 40 °C por 48 horas e posterior pulverização em um moinho criogênico. As análises foram realizadas com a linha principal do Cr (357,868 nm), sendo 3 *pixels* analisados (CP ± 1), sem o uso de modificador químico, com temperaturas de pirólise e atomização de 1500 e 2400 °C, respectivamente.

Krawczyk⁴⁸ (2014) determinou Cr, Cu, Fe, Mn Se, As, Cd e Pb em três diferentes suplementos multivitamínicos HR-CS GF AAS. Para a análise, as amostras sólidas foram convertidas em soluções através da adição de HNO₃ e Triton X-100 e posterior sonicação. O trabalho cita o uso de Pd(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂ (ou a mistura dos dois) ou NH₄H₂PO₄ como modificadores químicos para os elementos. É importante ressaltar que para Cr não foi utilizado nenhum modificador químico e para Fe foi utilizado apenas Mg(NO₃)₂.

Os analitos foram determinados separadamente, e os comprimentos de onda utilizados foram 193,696 nm (As), 228,801 nm (Cd), 324,754 nm (Cu), 357,868 nm (Cr), 248,327 nm (Fe), 279,481 nm (Mn), 283,306 nm (Pb) e 196,026 nm (Se). Todos os elementos (exceto Pb) foram determinados nos comprimentos de onda mais sensíveis, entretanto, a linha principal de Pb (217,001 nm) apresentou interferências espectrais não identificadas. Dessa forma, a autora optou por usar uma linha secundária, sem interferentes. As temperaturas de pirólise variaram de 600 a 1300 °C e as temperaturas de atomização variaram de 1300 a 2300 °C.⁴⁸

Santos *et al.*⁴⁴ (2017) desenvolveram um método para a determinação simultânea de Cu e Fe em farinhas usando a análise direta de amostras sólidas e a HR-CS GF AAS. Para isso, as amostras foram diretamente pesadas na plataforma de grafite e submetidas ao programa de aquecimento que utilizava 1400 e 2400°C como temperaturas de pirólise e atomização, respectivamente. Foram utilizadas as linhas secundárias em 217,894 nm para Cu e 217,812 nm para Fe e foram avaliados 5 *pixels* para Cu (CP ± 2) e 3 *pixels* para Fe (CP ± 1). Não foram observadas interferências e nenhum modificador químico foi utilizado.

Adolfo *et al.*⁴⁹ (2019) otimizaram um método para a determinação simultânea de Fe e Ni presentes como contaminantes em suplementos multiminerais e multivitamínicos por análise direta de sólidos utilizando a técnica de HR-CS GF AAS. Com o objetivo de evitar interferências espectrais, as medidas foram realizadas com as linhas secundárias de Fe e Ni, localizadas em 352,604 e 352,454 nm, respectivamente. Os sinais foram avaliados utilizando 5 *pixels* para ambos os elementos (CP ± 2). As temperaturas de pirólise e atomização utilizadas foram, respectivamente, 1000 e 2700 °C. Modificadores químicos não foram necessários e não foram observados efeitos de matriz.

Zvěřina *et al.*⁵⁰ (2019) apresentaram um método para determinação simultânea de Cd e Fe em flocos de cereais usando a HR-CS GF AAS. A linha primária de Cd em 228,802 nm e uma linha secundária de Fe em 228,725 nm foram utilizadas para o estudo. Os sinais foram avaliados utilizando 3 *pixels* para os dois elementos ($CP \pm 1$). O preparo das amostras consistiu na digestão ácida em micro-ondas, utilizando HNO₃ e H₂O₂. Nesse trabalho, considerando que Cd e Fe apresentam volatilidades significativamente diferentes, o programa de temperatura precisou refletir seu comportamento térmico cuidadosamente. Assim, foram utilizadas duas temperaturas de pirólise (350 e 700 °C) e duas temperaturas de atomização (1250 °C e 2325 °C para Cd e Fe, respectivamente).

Foram utilizados 5 µL de uma mistura contendo 1 g L⁻¹ Pd e 0,6 g L⁻¹ Mg(NO₃)₂ como modificador químico, para a estabilização dos analitos. Com a adição desse modificador, foi possível utilizar uma temperatura de pirólise de 700 °C sem que houvesse perda de Cd por vaporização. Foi observada uma interferência produzida pela presença de moléculas de PO, que foi suprimida pelo modelo de correção usando correção de LSBC.⁵⁰

Adolfo *et al.*⁵¹ (2020) compararam o método de amostragem direta de sólidos com método convencional de digestão ácida para determinar simultaneamente Fe e Ni em guaraná através da técnica de HR-CS GF AAS. As medições foram feitas com as linhas secundárias de Fe e Ni, 352,604 e 352,454 nm, respectivamente. Foram avaliados 5 *pixels* ($CP \pm 2$) para os dois elementos. Quatro procedimentos de digestão usando misturas de (a) HNO₃ e H₂O₂, (b) HNO₃ e HCl, (c) HNO₃, HCl e H₂O₂ e (d) HNO₃, H₂SO₄ e H₂O₂ realizados em bloco digestor foram avaliados. Para a análise direta das amostras, aquelas que se encontravam na forma sólida foram moídas e bem misturadas com almofariz e pistilo, para garantir a homogeneidade, enquanto as amostras em cápsulas foram abertas e o conteúdo analisado diretamente sem pré-tratamento. Não foi necessário o uso de modificador químico e não foram observadas interferências espectrais.

Santos *et al.*⁵² (2019) realizaram a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras de leite em pó através da técnica de HR-CS GF AAS. As amostras foram digeridas em micro-ondas utilizando HNO₃ e H₂O₂. O método foi estabelecido usando a linha primária (357,869 nm) para o Cr e a linha secundária adjacente (358,120 nm) para o Fe, empregando alumínio como modificador

químico. Foram utilizados 3 *pixels* ($CP \pm 1$) para a avaliação do sinal analítico dos dois elementos. As temperaturas de pirólise e atomização otimizadas foram 1000 e 2500 °C, respectivamente. Não foram observadas interferências.

Já que não foram encontrados na literatura trabalhos que realizem a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras semelhantes às de suplementos alimentares, para ilustrar a possibilidade dessa análise através da técnica de HR-CS GF AAS e a SS, cita-se o trabalho realizado por Dittert *et al.*⁴⁶, no qual Cr e Fe são determinados simultaneamente em amostras de petróleo bruto (considerado um líquido de alta viscosidade). As amostras não precisaram de nenhum preparo, sendo apenas submetidas a um banho ultrassônico para sua homogeneização e, em seguida, foram pesadas diretamente na plataforma de grafite. Para a análise, foram utilizadas a linha principal do Cr (357,869 nm) e uma linha secundária do Fe (358,120 nm). Para a avaliação do sinal analítico, foram avaliados 3 *pixels* ($CP \pm 1$), tanto para Cr como para Fe. As temperaturas de pirólise e atomização escolhidas para o estudo foram 1400 e 2500 °C, respectivamente e não foi necessário o uso de modificadores químicos.

Nesse contexto, a HR-CS GF AAS se torna uma técnica atrativa para a determinação de minerais em suplementos alimentares, já que oferece a possibilidade de amostragem direta de sólidos, além da possibilidade de determinações elementares simultâneas.

4. Procedimentos experimentais

4.1. Instrumentação e condições experimentais

Para todas as medidas, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo contrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha). O equipamento é equipado com atomizadores de chama e tubo atomizador de grafite aquecido transversalmente, em compartimentos separados, sendo que somente o segundo foi utilizado.

Como fonte de radiação, foi usada uma lâmpada de arco curto de Xe sob alta pressão com operação em modo “*hot-spot*”, que emite espectro contínuo entre 190 e 900 nm. O espectrômetro é equipado com um monocromador duplo de alta resolução (prisma e rede de difração *echelle*) e um CCD, com 588 pixels, sendo 200 deles usados para fins analíticos.

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

Tabela 2. Programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação simultânea de Cr e Fe via HR-CS GF AAS utilizando a SS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa de aquecimento (°C s ⁻¹)	Tempo (s)	Fluxo de gás L min ⁻¹
Secagem	110	3	20	2,0
Secagem	150	5	20	2,0
Pirólise	1200	100	30	2,0
Atomização	2600	FP*	6	**
Limpeza	2650	500	4	2,0

*FP: Full Power ($\approx 3000 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$).

**Variável conforme a condição.

Foram usadas as linhas de 357,869 nm (linha principal) e 358,120 nm (1% de sensibilidade relativa) para monitorar os sinais analíticos de Cr e Fe, respectivamente.

Durante o estudo, percebeu-se que as amostras investigadas apresentavam diferentes concentrações de Cr e Fe. Assim, foram necessários alguns ajustes nas condições instrumentais relacionadas à vazão de Ar durante a etapa de atomização e ao número de *pixels* utilizados para avaliar os valores de absorvância integrada (A_{int}). As diferentes condições instrumentais utilizadas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições instrumentais utilizadas durante a etapa de atomização e avaliação do sinal de Cr e Fe.

Condição	Analito	Fluxo de Gás L min ⁻¹	<i>Pixels</i>	Faixa de Trabalho
1	Cr	0,1	CP	50 – 3000 pg
	Fe	0,1	CP	14 – 700 ng
	Fe	0,1	-3/+3	19 – 1000 ng
2	Cr	0	CP \pm 1	32 – 750 pg
	Fe	0	CP	4,0 – 150 ng

Durante o desenvolvimento do método para análise, primeiramente foi avaliada uma condição que permitisse a determinação de Cr e Fe levando em consideração as altas concentrações dos analitos nas amostras. Para que fosse possível a quantificação desses analitos em amostras de suplementos alimentares, foi utilizado fluxo mínimo de Ar durante a etapa de atomização ($0,1 \text{ L min}^{-1}$), e apenas CP foi empregado para a avaliação do sinal analítico para os dois analitos. Essas medidas foram adotadas com o objetivo de reduzir os valores de A_{int} obtidos para Cr e Fe. Essa condição foi chamada de condição 1, sendo a condição principal utilizada para o desenvolvimento do trabalho.

Apesar da condição 1 permitir a quantificação da maior parte das amostras, verificou-se que algumas delas continham concentrações extremamente elevadas de Fe e, mesmo utilizando uma linha com 1% de sensibilidade relativa, fluxo de Ar na atomização, e apenas o *pixel* central para avaliação do sinal analítico, os valores de A_{int} extrapolavam os limites de uma faixa de trabalho confiável.

Dessa forma, para as amostras com elevado teor de ferro foi adotada uma variação da Condição 1, na qual foram alterados os *pixels* avaliados: apenas os *pixels* laterais (-3/+3) foram utilizados para a avaliação do sinal analítico. Ressalta-se que nessa variação o fluxo mínimo de Ar ($0,1 \text{ L min}^{-1}$) foi mantido durante a etapa de atomização.

Essa alteração foi considerada uma variação da condição 1 pois consistiu apenas em uma modificação nos *pixels* usados para a avaliação do sinal de Fe, de modo que as demais condições utilizadas para realizar as medidas permaneceram as mesmas: com fluxo mínimo de Ar ($0,1 \text{ L min}^{-1}$) na etapa de atomização e apenas um *pixel* para avaliação do sinal analítico de Cr.

Continuando os estudos, verificou-se que algumas amostras apresentaram concentrações de Cr abaixo do Limite de Detecção (LOD), quando a condição 1 foi aplicada. Assim, foi necessário adotar medidas com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método para determinação desse analito. Dessa forma, foi desenvolvida uma segunda condição, chamada de condição 2, na qual o fluxo de Ar foi cessado durante a etapa de atomização e 3 *pixels* ($\text{CP} \pm 1$) foram avaliados para a linha do cromo.

Essa condição foi desenvolvida tanto para Cr quanto para Fe, sendo a condição mais sensível para os dois elementos. Como durante o

desenvolvimento do trabalho verificou-se que não havia necessidade de aumentar a sensibilidade para Fe, já que a Condição 1 compreendia as concentrações desse analito nas amostras, para esse elemento foi avaliado apenas o *pixel* central (CP) nessa condição.

4.2. Reagentes

Reagentes de grau analítico foram utilizados durante todo o desenvolvimento do trabalho. Água deionizada com resistividade de 18 M Ω cm foi obtida através de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e foi utilizada para o preparo de soluções, diluições e limpeza dos materiais empregados. O procedimento de limpeza das vidrarias utilizadas nesse trabalho consistiu na sua imersão em uma solução de HNO₃ 1,4 mol L⁻¹ por, no mínimo, 24h e posterior lavagem com água deionizada. Em seguida, as vidrarias foram secadas em uma capela de fluxo laminar modelo Hexiclean (Biosystem, Curitiba, Brasil).

As soluções padrão multi-elementares foram preparadas a partir de soluções estoque de Cr e Fe de 1000 mg L⁻¹ (Specsol, Jacareí, Brasil). Com o objetivo de otimizar as condições experimentais, foi preparada, primeiramente, uma solução padrão multi-elementar contendo 350 pg Cr e 40 ng Fe (10,0 μ L de uma solução com 35,0 μ g L⁻¹ Cr e 4,0 mg L⁻¹ Fe). Após serem realizadas algumas otimizações utilizando esta solução, optou-se pelo preparo de uma solução mais concentrada de ambos os analitos para obter valores de A_{int} mais elevados. Assim, uma solução contendo 750 pg Cr e 80 ng Fe (10,0 μ L de uma solução com 75,0 μ g L⁻¹ Cr e 8,0 mg L⁻¹ Fe) foi utilizada para finalizar as otimizações do método.

A faixa de concentração de Cr e Fe utilizada nas curvas de calibração variaram de 3,2 – 300 μ g L⁻¹ e 0,4 – 100 mg L⁻¹, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em HNO₃ 0,014 mol L⁻¹.

Diferentes reagentes foram investigados como possíveis modificadores químicos, cada um com as diluições adequadas. As soluções de Pd e Mg foram avaliadas tanto separadamente quanto combinadas e foram preparadas a partir de soluções estoque contendo 10,0 \pm 0,2 g L⁻¹ de Pd(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Uma solução de 5 g L⁻¹ de NH₄H₂PO₄ foi preparada a partir do sal (Merck) e dissolvida em água deionizada, sendo posteriormente

diluída para as concentrações adequadas. Também foi utilizado peróxido de hidrogênio 30% (Merck), sem diluições.

Os ácidos inorgânicos, HCl 37% (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), HNO₃ 63% (Química Moderna, Barueri, Brasil) e H₂SO₄ 98% (Merck) foram diluídos com água deionizada para as concentrações adequadas. O HCl utilizado foi destilado e o HNO₃ foi bidestilado em um destilador de quartzo (Marconi, São Paulo, Brasil). Todas as soluções citadas acima como possíveis modificadores químicos foram preparadas com Triton X-100 0,05% (v/v) (Union Carbide, Houston, EUA), com o objetivo de melhorar a interação entre a amostra sólida e a solução de modificador químico.^{53,54}

4.3. Amostras e material de referência certificado

Amostras de suplementos alimentares foram adquiridas em farmácias e supermercados de Porto Alegre, Brasil. Dez amostras foram avaliadas: quatro fórmulas infantis, nomeadas nesse estudo como “FI” e numeradas de 1 a 4, e seis multivitamínicos, nomeados como “MV” e numerados de 1 a 6. As amostras são comercializadas em três diferentes formas: pó, cápsulas e comprimidos.

Na Tabela 4 estão apresentadas as formas como cada amostra é comercializada, bem como as quantidades mínimas e máximas de consumo diário de cada produto recomendadas pelos fabricantes (descrito no rótulo). Nota-se que para as amostras comercializadas nas formas de cápsulas e comprimidos, as recomendações mínimas e máximas para cada produto são as mesmas. Isso ocorre pois o fabricante descreve apenas uma recomendação de consumo, por exemplo, no rótulo da amostra MV1 consta a recomendação de consumo de um comprimido (que contém 1,32g) por dia. Além disso, a amostra MV3 não apresenta recomendação diária de consumo. No rótulo apenas é citado o preparo do suplemento, sendo esse, 3 colheres do produto (27g) para um copo de leite.

Tabela 4. Amostras de suplementos alimentares avaliadas, com tipo de amostra, códigos, faixa etária recomendada, formas de comercialização e recomendação de consumo diário pelo fabricante.

Tipo de Amostra	Código	Faixa Etária Recomendada	Forma de Comercialização	Recomendação do Fabricante (g de suplemento por dia)	
				Mínima	Máxima
Fórmulas Infantis	FI1	0 a 6 meses	Pó	51,6	180,6
	FI2	0 a 6 meses	Pó	52,8	184,8
	FI3	0 a 6 meses	Pó	65,7	183,96
	FI4	0 a 6 meses	Pó	64,5	180,6
Multivitamínicos	MV1	≥ 19 anos	Comprimido	1,32	1,32
	MV2	≥ 19 anos	Pó	69,96	209,88
	MV3	Até 18 anos	Pó	NI	NI
	MV4	≥ 19 anos	Cápsula	1,1	1,1
	MV5	≥ 19 anos	Cápsula	0,55	0,55
	MV6	≥ 19 anos	Comprimido	0,63	0,63

*NI = não informado.

Para a análise, as fórmulas infantis (FI) e as amostras MV2 e MV3 foram diretamente inseridas na plataforma de grafite, sem necessidade de preparo. O preparo das amostras MV4 e MV5 consistiu apenas na abertura das cápsulas, seguido pela análise direta do pó contido em seu interior, sendo a capsula descartada. As amostras MV1 e MV6 foram maceradas com almofariz e pistilo e o pó resultante foi analisado. Apesar do pó obtido para essas amostras se apresentar heterogêneo, as amostras não foram peneiradas com o objetivo de garantir que todo o conteúdo dos comprimidos fosse analisado. Todas as amostras foram armazenadas em tubos de plástico previamente descontaminados.

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada através da análise do SRM NIST 8415 de ovo inteiro em pó (*Whole Egg Powder*) (*National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, EUA), já que não havia um CRM de

suplementos alimentares disponível no laboratório. Não foi necessário nenhum preparo para o SRM 8415 antes da análise.

4.4. Procedimento analítico

O método foi otimizado utilizando duas soluções padrão multi-elementares. A primeira, contendo 350 pg Cr e 40 ng Fe (10,0 µL de uma solução com 35,0 µg L⁻¹ Cr e 4,0 mg L⁻¹ Fe), foi utilizada para o estudo de modificadores e a segunda, contendo 750 pg Cr e 80 ng Fe (10,0 µL de uma solução com 75,0 µg L⁻¹ Cr e 8,0 mg L⁻¹ Fe), foi utilizada para o restante das otimizações. A solução multi-elementar foi manualmente pipetada na plataforma de grafite, seguida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) + 0,05% Triton X-100 como modificador químico. A plataforma foi, então, inserida dentro do forno de grafite, onde o programa de aquecimento apresentado na Tabela 1 foi iniciado. As amostras e o SRM foram pesadas diretamente na plataforma de grafite, utilizando uma microbalança MP2, com a posterior adição de 20 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) + 0,05% Triton X-100 cobrindo a amostra/SRM. Em seguida a plataforma foi inserida no forno de grafite para o início da análise.

Para as curvas de calibração, 10 µL das diferentes soluções padrão multi-elementares foram pipetadas diretamente na plataforma de grafite, com a posterior adição de 20 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) + 0,05% Triton X-100. As medidas do branco foram realizadas com apenas 20 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) + 0,05% Triton X-100 na plataforma. É importante ressaltar que os valores de A_{int} para Cr e Fe foram sempre obtidos a partir da mesma alíquota de padrão ou amostra introduzida no forno de grafite, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3.

4.5. Parâmetros de mérito

4.5.1. Avaliação da exatidão

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados pelo método desenvolvido em relação a um valor de referência,

considerado como verdadeiro. Os materiais de referência têm alto grau de pureza e suas características são conhecidas. Por isso, sempre que possível, eles devem ser utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico.³⁴ Para esse estudo, conforme citado anteriormente, foi analisado o SRM NIST 8415 *Whole Egg Powder*.

4.5.2. Avaliação da precisão

A precisão do método representa a reprodutibilidade entre as medidas, isto é, a proximidade entre resultados que foram obtidos da mesma forma.⁵⁵ No presente trabalho, a precisão foi avaliada através do desvio padrão, representado nas figuras pelas barras de erro, e desvio padrão relativo (RSD), sendo esses valores obtidos com $n = 3$ medidas para o padrão e $n = 5$ medidas para as amostras. Assim, quanto menor o desvio padrão e o desvio padrão relativo, maior a proximidade entre os resultados e, portanto, mais precisos.

4.5.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) é a quantidade mínima detectável, com uma dada certeza analítica. É uma medida da concentração ou massa do analito, que quando excedida, permite o reconhecimento, com uma dada certeza estatística, que a quantidade de analito na amostra é maior que a do branco da mesma.³⁴

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) pode ser definido como a menor massa ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente, com um risco de erro inferior a 5%.^{34,56}

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados como três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez medidas do branco, dividido pelo coeficiente angular da regressão linear obtida a partir da curva de calibração, também conhecido como sensibilidade.^{34,56}

As medidas do branco foram executadas conforme a técnica de “resposta a massa zero”⁵⁷, que consistiu em submeter, repetidamente, 20 μL de H_2SO_4 1% + 0,05% Triton X-100, adicionados à plataforma, ao programa de temperatura apresentado na Tabela 2.

A massa de 2,00 mg, que foi o limite máximo de amostra possível de ser analisado, foi utilizado para calcular o LOD e LOQ do método, que se dão através da divisão do LOD e LOQ calculados anteriormente pela massa máxima de amostra.³⁴

4.5.4. Massa Característica

A massa característica, m_0 , é definida como a massa de analito necessária para produzir um sinal de A_{int} de $0,0044 \text{ s}^{-1}$. A m_0 foi calculada pela relação direta entre o valor de A_{int} de um dos padrões empregados na construção das curvas de calibração com o valor acima descrito.

5. Resultados e discussão

5.1. Estudos preliminares

Como mencionado na introdução, é possível monitorar, simultaneamente, as linhas analíticas de Cr e Fe, em 357,869 e 358,120 nm, respectivamente. Por essa razão, o primeiro passo do trabalho consistiu na avaliação dos sinais de Cr e Fe, através de uma varredura nas dez amostras investigadas, para verificar se estavam em concordância com a sensibilidade das linhas utilizadas (100% de sensibilidade para Cr e 1% de sensibilidade relativa para Fe). Esses experimentos foram realizados sem o uso de modificadores químicos, com temperatura de pirólise (T_{pir}) de 1300 °C e com temperatura de atomização (T_{atm}) de 2600 °C, conforme relatado por Boschetti *et al.*⁵⁸

Assim, foi verificado que as concentrações de Cr e Fe presentes nas amostras de suplementos alimentares eram compatíveis com a sensibilidade das linhas analíticas, sendo a determinação simultânea dos dois analitos possível, conforme mostra a Figura 5. Ainda, nenhuma interferência espectral com possível sobreposição dos sinais analíticos, devido a moléculas diatômicas, foi observada durante essa investigação. Para complementar os testes, a solução padrão de 350 pg de Cr e 40 ng de Fe também foi analisada.

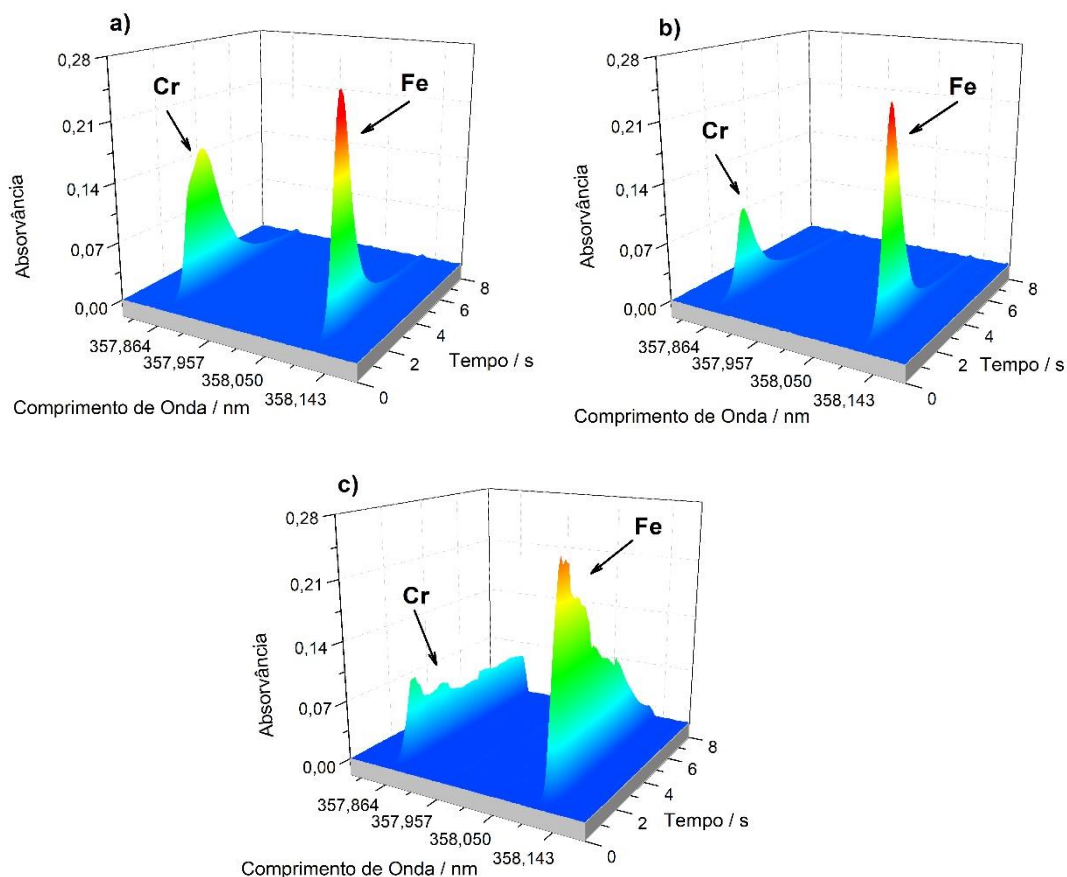


Figura 5. Espectros resolvidos no tempo para: **a)** solução padrão de 350 μg de Cr e 40 ng de Fe; **b)** amostra MV2 ($m_{\text{MV2}} = 0,816 \text{ mg}$) e **c)** amostra MV1 ($m_{\text{MV1}} = 0,190 \text{ mg}$) obtidas na região das linhas analíticas de Cr (357,869 nm) e Fe (358,120 nm), na ausência de modificadores químicos *via* HR-CS GF AAS e análise direta de amostras sólidas. $T_{\text{pir}} = 1300 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{atm}} = 2600 \text{ }^\circ\text{C}$ sem fluxo de Ar durante a etapa de atomização.

Observou-se, através dos resultados, que as amostras apresentaram uma ampla faixa de concentração tanto para Cr quanto para Fe. Além disso, verificou-se que para a solução padrão, para todas as amostras de FI e para as amostras MV2 e MV3, os resultados obtidos foram reprodutíveis, com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 10%, e picos simétricos foram obtidos na ausência de modificador químico, conforme mostrado nas Figuras 5a e 5b. No entanto, as amostras MV1, MV4, MV5 e MV6 apresentaram um significativo efeito de matriz, como pode-se observar, através do sinal analítico da Figura 5c, para a amostra MV1. Essa distorção no sinal, provocada pela interferência de matriz, sobre os

sinais de ambos os analitos, refletiu-se nos valores de RSD, que foram superiores a 50% para essas amostras.

Com o objetivo de eliminar os efeitos de matriz nessas amostras, sem a necessidade do emprego de modificadores químicos, foram investigadas diferentes temperaturas de pirólise (T_{pir}), variando de 1000 a 1400 °C. Entretanto, não foram observadas mudanças significativas nos perfis dos picos e nos valores de RSD.

Em uma outra tentativa de contornar os problemas de matriz e considerando os elevados teores de Cr e Fe nas amostras MV1, MV4, MV5 e MV6, foi empregada a vazão mínima de Ar ($0,1 \text{ L min}^{-1}$) durante a etapa de atomização, com o objetivo de diluir a matriz da amostra. Conforme esperado, a sensibilidade dos analitos foi reduzida com a adição de fluxo de Ar; entretanto, os valores de RSD permaneceram acima de 30%, já que não foi observada melhora na simetria dos perfis de Cr e Fe.

Após realizar a varredura em todas as amostras, concluiu-se que a determinação simultânea de Cr e Fe para as amostras de suplementos alimentares seria possível. Além disso, observou-se que algumas delas, principalmente aquelas comercializadas na forma de pó (FI1, FI2, FI3, FI4, MV2 e MV3), apresentavam sinais analíticos simétricos para Cr e Fe. As outras, porém, resultaram em picos com ombros e cauda. Nenhuma amostra apresentou interferências espectrais, entretanto os valores entre as replicatas de cada amostra não eram reprodutíveis, resultando em altos valores de RSD.

Assim, julgou-se necessária a realização de um estudo de modificadores químicos, na tentativa de obter sinais analíticos simétricos e precisos.

5.2. Modificadores químicos para a determinação simultânea de Cr e Fe

Usualmente, Cr e Fe podem ser determinados sem o uso de modificadores químicos.^{44,46,47,48,49,51} Conforme mencionado na sessão anterior, para a solução padrão multi-elementar de Cr e Fe e para as quatro amostras de FI e MV2 e MV3, os sinais analíticos eram simétricos para os dois analitos, com RSD menor que 6% para o padrão e menor que 10% para as amostras. Já algumas amostras de suplementos alimentares apresentaram sérios efeitos de matriz sobre os

sinais analíticos, que não puderam ser solucionados com as variações nas temperaturas de pirólise.

Assim, com o objetivo de desenvolver um método que pudesse ser aplicado a todas as amostras, desde as mais simples até aquelas que apresentavam as matrizes mais complexas, a amostra MV1 foi escolhida para realizar as otimizações experimentais, por apresentar efeito de matriz bastante significativo.

Portanto, uma investigação sobre o efeito de diferentes modificadores químicos sobre os sinais de Cr e Fe foi realizada utilizando a amostra MV1, e uma solução padrão contendo 350 pg Cr e 40 ng Fe (10 µL de uma solução com 35 µg L⁻¹ Cr e 4,0 mg L⁻¹ Fe).

5.2.1. $Mg(NO_3)_2$

O magnésio (geralmente como $Mg(NO_3)_2$) é o modificador químico mais utilizado nas determinações de Cr ou Fe *via* HR-CS GF AAS.^{48,50,59,60} Assim, as quantidades de 5,0 (recomendado pelo fabricante do equipamento), 10, 20 e 40 µg Mg (10 µL de soluções de Mg 0,05 – 0,40% (v/v), respectivamente) foram pipetadas sobre a amostra MV1, previamente pesada na plataforma de grafite, para posterior avaliação de sinais de Cr e Fe. Os primeiros experimentos foram realizados utilizando 1100 °C como T_{pir} , temperatura recomendada para Fe pelo fabricante do equipamento, e 2600 °C como T_{atm} , com vazão de Ar de 0,1 L min⁻¹ durante a etapa de atomização.

Independente da concentração de Mg adicionada não foram observadas melhorias significativas nos sinais, resultando em picos duplos e com cauda para os dois analitos (Figura 6). Para essas condições, os valores de RSD para os dois analitos foram bastante elevados, maiores que 30%.

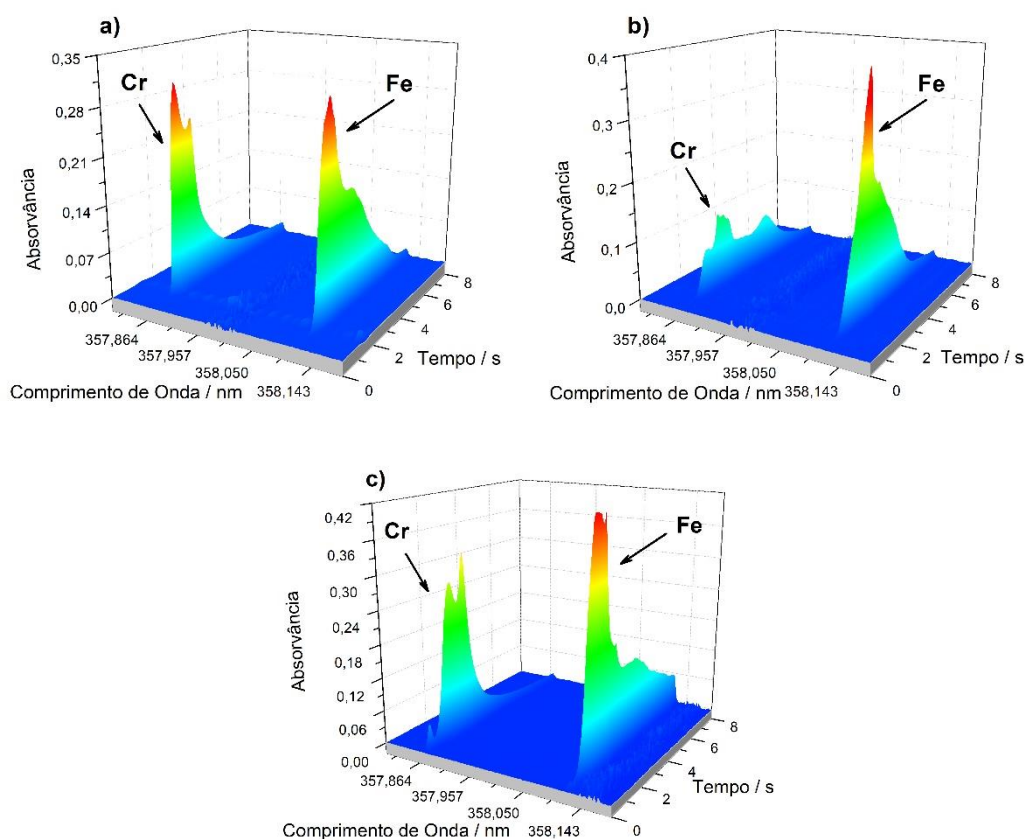


Figura 6. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando **a)** 5,0 μg ($m_{\text{MV1}} = 0,071 \text{ mg}$), **b)** 20 μg Mg ($m_{\text{MV1}} = 0,028 \text{ mg}$) e **c)** 40 μg Mg ($m_{\text{MV1}} = 0,084 \text{ mg}$) como modificador químico. $T_{\text{pir}} = 1100 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{atm}} = 2600 \text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de 0,1 L min^{-1} Ar durante a etapa de atomização.

Considerando que o fabricante do equipamento sugere o uso de 1300 $^\circ\text{C}$ como T_{pir} para as determinações de Cr, o efeito de 5,0 a 40 μg de Mg sobre os sinais de Cr e Fe foi avaliado usando essa temperatura. Mais uma vez, não foram observadas melhorias nos perfis dos sinais analíticos e os valores de RSD permaneceram elevados. Essas mesmas condições foram utilizadas para avaliar a solução padrão de Cr e Fe e, como resultado, a presença de Mg não influenciou os sinais dos analitos, em comparação com aqueles obtidos na ausência de modificadores químicos (Figura 5a). Considerando a complexidade da amostra MV1, optou-se por utilizar a T_{pir} de 1300 $^\circ\text{C}$ para prosseguir com os experimentos com outros modificadores químicos.

5.2.2. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

Sabe-se que o dihidrogenofosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) pode ser usado para reduzir os efeitos da matriz nas análises por LS GF AAS e HR-CS GF AAS.^{61,62,63} Assim, foi avaliado o efeito do uso de diferentes quantidades de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 10 a 40 μg (10 μL de soluções de 1,0 – 4,0 g L^{-1} de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), adicionado diretamente sobre a amostra MV1 previamente pesada na plataforma de grafite.

Com a adição desse modificador, os valores de RSD diminuíram um pouco, com valores em torno de 25%, mas ainda considerados altos. Foi observada uma melhora significativa na simetria do sinal analítico de Cr. Entretanto, os sinais obtidos para Fe continuaram apresentando efeitos de matriz (Figura 7a).

Também foi testada a solução padrão com 350 μg Cr e 40 ng Fe com a adição das mesmas concentrações de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e, nesse caso, não foram notadas diferenças significativas entre as concentrações de modificador adicionadas. Os perfis dos sinais analíticos de Cr e Fe apresentaram-se simétricos (Figura 7b).

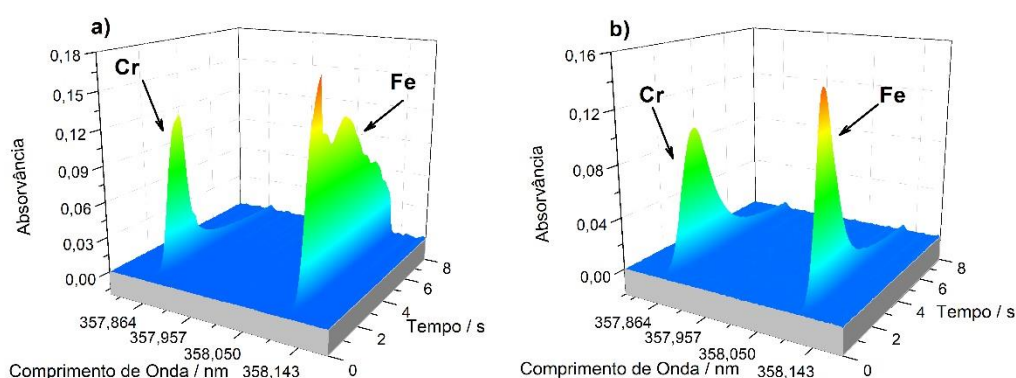


Figura 7. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{\text{MV1}} = 0,026 \text{ mg}$) e **b)** solução padrão de 350 μg Cr e 40 ng Fe usando 40 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico. $T_{\text{pir}} = 1300 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{atm}} = 2600 \text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de 0,1 L min^{-1} Ar durante a etapa de atomização.

5.2.3. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

Em seguida, a combinação de Mg e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, dentro das faixas de massa anteriormente investigadas separadamente, usando diluições adequadas de

cada solução estoque, nunca ultrapassando o volume máximo de 40 µL na plataforma de grafite, foi investigada. Essa combinação resultou em picos mais simétricos tanto para Cr quanto para Fe, com valores de RSD de aproximadamente 20% (para a combinação de 40 µg Mg + 40 µg NH₄H₂PO₄) para a amostra MV1 (Figura 8a).

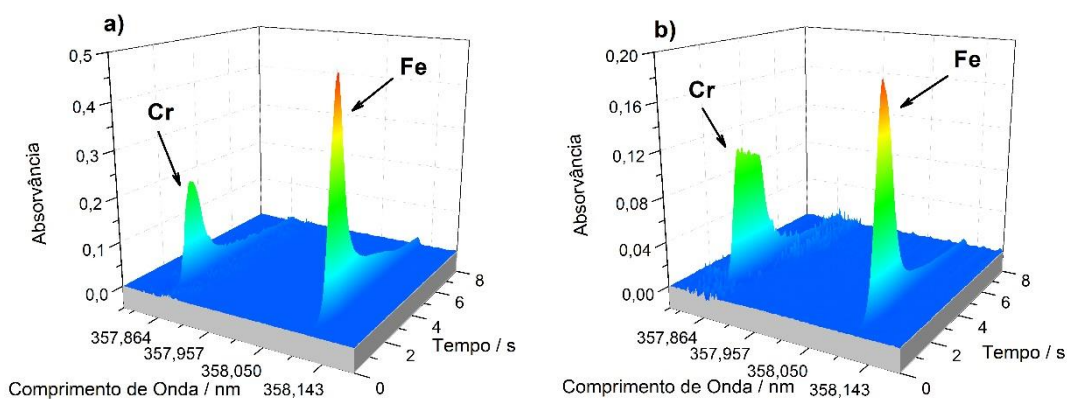


Figura 8. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,051$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 40 µg Mg + 40 µg NH₄H₂PO₄ como modificadores químicos. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.

Como a adição da combinação de 40 µg Mg + 40 µg NH₄H₂PO₄ sobre a amostra MV1 gerou sinais de Cr e Fe mais simétricos e menores valores de RSD, foi também testada com a solução padrão. Nessas condições, observou-se que o perfil do sinal analítico de Cr mudou, apresentando um platô em seu topo, que pode ocorrer devido à uma mudança no mecanismo de atomização do Cr, conforme mostrado na Figura 8b, em comparação ao obtido com o NH₄H₂PO₄, de forma independente (Figura 7b). Apesar dessa mudança de comportamento, os valores de RSD para Cr e Fe apresentaram-se abaixo de 2,4%. Levando-se em consideração o comportamento inesperado do Cr para o padrão, o estudo de modificadores químicos prosseguiu.

5.2.4. Pd(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂

Considerado um modificador universal por Welz *et al.*³⁴, a mistura Pd (Pd(NO₃)₂) e Mg também foi testada. Assim, foram adicionados 10 µg Pd + 6 µg

Mg (10 μ L Pd 0,1% e Mg 0,06% v/v juntos em uma única solução) sobre a amostra MV1 previamente pesada na plataforma de grafite.

Novamente, não foram observadas melhorias na simetria dos sinais analíticos de Cr e Fe, além de ser verificada a presença de uma cauda persistente mesmo após 8 segundos de tempo de integração, para os dois analitos (Figura 9). Além disso, o RSD para os dois elementos ficou acima de 30%.

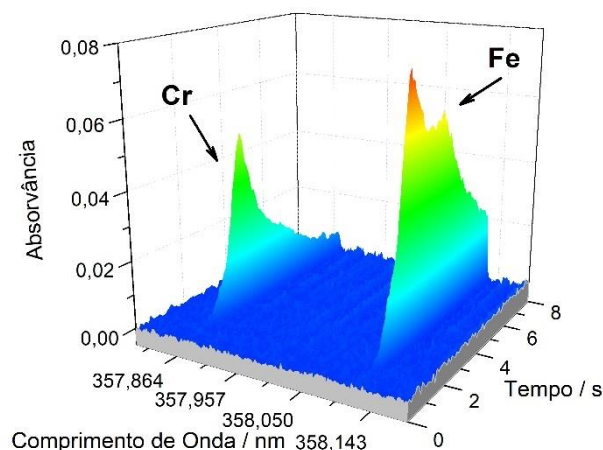


Figura 9. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando 10 μ g Pd + 6,0 μ g Mg ($m_{MV1} = 0,048$ mg) como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min^{-1} Ar durante a etapa de atomização.

5.2.5. $Pd(NO_3)_2$

Em seguida, foi avaliado o efeito da adição de apenas Pd. A adição de 10 μ g de Pd (10 μ L de uma solução Pd 0,1%) tanto sobre a amostra quanto sobre o padrão apresentou resultados semelhantes: uma melhora significativa na simetria dos sinais analíticos foi observada. Essa condição, entretanto, ainda não pôde ser considerada ideal devido à insistente presença de cauda, em ambos os analitos (Figura 10), que afetou a repetibilidade entre as replicatas, com RSD maior que 30% para os dois elementos e que não poderia ser eliminada através da variação da T_{atm} , já que temperaturas maiores que a utilizada não podem ser empregadas.

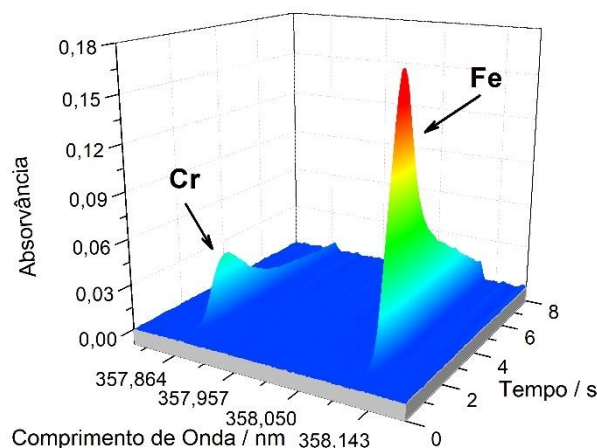


Figura 10. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando 10 μg Pd ($m_{\text{MV1}} = 0,021 \text{ mg}$) como modificador químico. $T_{\text{pir}} = 1300 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{atm}} = 2600 \text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de $0,1 \text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização.

Apesar dos modificadores testados serem recomendados para diversos analitos, incluindo os estudados no presente trabalho, eles não foram efetivos para a determinação simultânea de Cr e Fe em suplementos alimentares, já que nenhum deles conseguiu, simultaneamente, melhorar a simetria dos perfis dos sinais analíticos (padrão e amostra), eliminar a cauda e garantir a repetibilidade das medidas.

5.2.6. H_2O_2

Comumente utilizado no procedimento de digestão de amostras em micro-ondas^{17,20,30–32,50,52}, e conhecido como um reagente oxidante³⁴, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi testado como um possível modificador químico. Assim, 10 μL de uma solução H_2O_2 30% (m/v) foi adicionada diretamente sobre a amostra MV1, previamente pesada na plataforma de grafite. Nessa condição, os picos se apresentaram com muita cauda, tanto para Cr quanto para Fe (Figura 11). Observa-se que essa cauda tem um perfil diferente daquela observada com Pd, o que pode estar relacionado aos mecanismos de atomização do Cr e Fe. Além disso, o RSD resultante entre as replicatas para Fe foi de 55%. Considerando os

perfis dos sinais analíticos obtidos para a amostra MV1, a solução padrão não foi testada nessa condição.

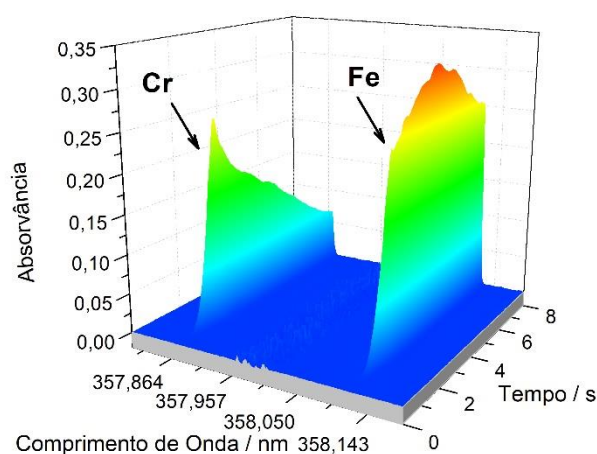


Figura 11. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta, para a amostra MV1 usando 10 μL H_2O_2 30% ($m_{\text{MV1}} = 0,087$ mg) como modificador químico. $T_{\text{pir}} = 1300$ °C, $T_{\text{atm}} = 2600$ °C e fluxo de $0,1$ L min^{-1} Ar durante a etapa de atomização.

5.2.7. Ácidos inorgânicos

Considerando a ineficiência dos modificadores químicos descritos acima, foi adotada uma abordagem diferente. Após buscas na literatura, verificou-se que Frech *et al.*⁶⁴ mencionou o uso de ácidos inorgânicos como modificadores químicos para auxiliar na separação dos concomitantes antes da etapa de atomização.³⁴

Assim, primeiramente, optou-se por realizar testes com ácido clorídrico (HCl). Uma alíquota de 20 μL de uma solução de HCl 1% foi adicionada sobre a amostra MV1 previamente pesada na plataforma de grafite e os resultados obtidos foram muito satisfatórios: os perfis dos sinais analíticos apresentaram-se mais simétricos (Figura 12a) se comparados aos resultados obtidos com outros reagentes e os valores de A_{int} foram reproduzíveis para os dois analitos, obtendo-se um RSD inferior a 20% para Cr e Fe.

O passo seguinte consistiu em testar a solução padrão com a adição de HCl. Como mostrado na Figura 12b, os sinais analíticos obtidos também foram simétricos para os dois analitos, observando-se apenas um pequeno ombro no

pico do Cr, que não comprometeu a precisão dos resultados uma vez que os valores de RSD, para a solução padrão, ficaram abaixo de 5%.

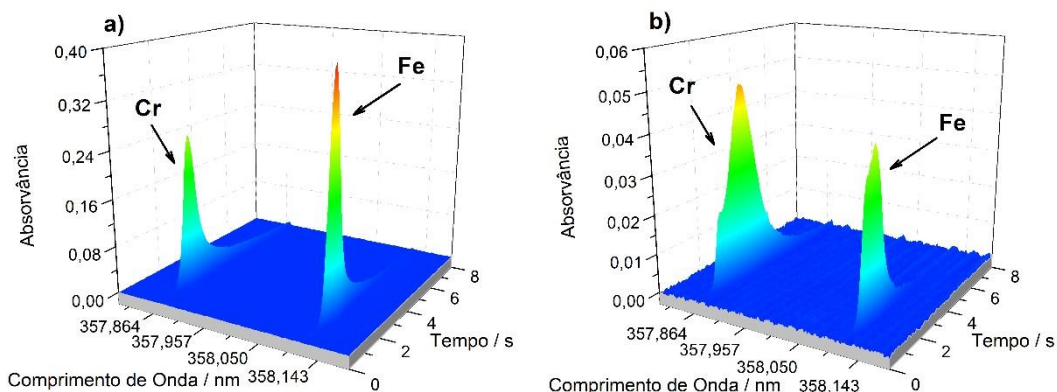


Figura 12. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,057$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 20 μ L de HCl 1% como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min^{-1} Ar durante a etapa de atomização.

Assim, as amostras MV2 e MV5 também foram testadas nas mesmas condições. Os resultados obtidos foram bastante similares àqueles evidenciados para a amostra MV1, com sinais analíticos simétricos e valores de RSD menores que 20%.

Apesar do HCl gerar resultados adequados para os sinais analíticos de Cr e Fe nas amostras de suplementos alimentares, optou-se por continuar a investigação de possíveis modificadores químicos. Assim, na sequência, foram testados mais dois ácidos inorgânicos: ácido nítrico (HNO_3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), com o objetivo de verificar se esses ácidos teriam o mesmo efeito sobre as amostras.

Os testes com HNO_3 foram realizados da mesma forma que os testes com HCl, isto é, adicionando-se 20 μ L de uma solução 1% sobre a amostra MV1, previamente pesada na plataforma de grafite. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados com a adição de HCl. Os perfis dos sinais analíticos de Cr e Fe obtidos para a amostra MV1 apresentaram-se simétricos (Figura 13a) e os resultados foram ainda mais reprodutíveis, com valores de RSD menores que 16% para os dois analitos.

A solução padrão também apresentou resultados semelhantes aos obtidos com a adição de HCl, com sinais analíticos com perfis semelhantes e valores de RSD novamente menores que 5% (Figura 12b).

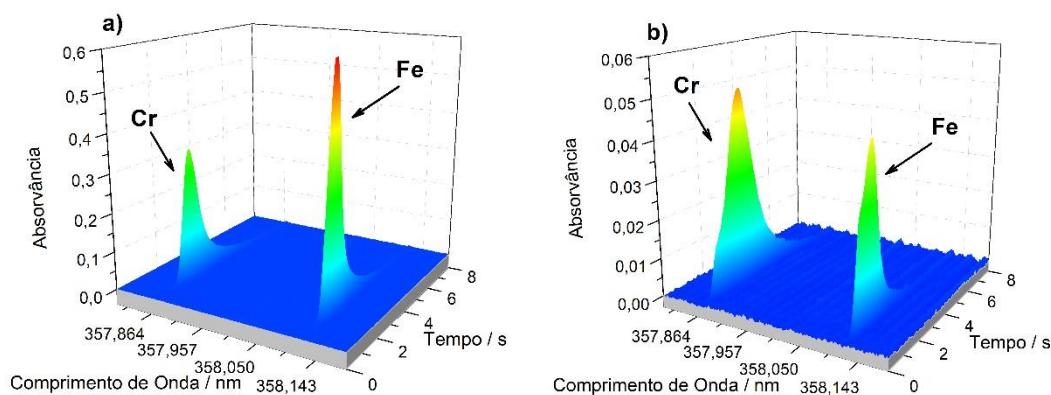


Figura 13. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,080$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 20 μ L de HNO₃ 1% como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.

Por fim, foram adicionados 20 μ L de uma solução de H₂SO₄ 1% sobre a amostra MV1 previamente pesada na plataforma de grafite.

Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados com a adição de HCl e HNO₃. Os perfis dos sinais analíticos de Cr e Fe obtidos para a amostra MV1 apresentaram-se simétricos e as análises foram ainda mais reprodutíveis, com valores de RSD menores que 14% para os dois analitos (Figura 14a).

Para a solução padrão, observou-se sinais um pouco mais simétricos que aqueles gerados com HCl e HNO₃, para os dois analitos (Figura 14b). Os valores obtidos com a adição de H₂SO₄ foram mais reprodutíveis do que os dos outros ácidos, demonstrado por valores de RSD menores que 2% para Cr e Fe.

Ressalta-se que, conforme mencionado anteriormente, as soluções preparadas com os três ácidos continham 0,05% Triton X-100 em sua composição.

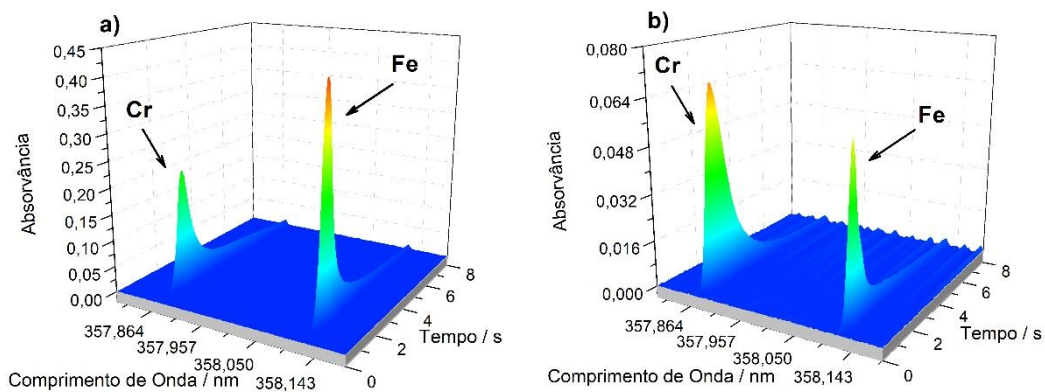


Figura 14. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta **a)** da amostra MV1 ($m_{MV1} = 0,042$ mg) e **b)** solução padrão de 350 pg Cr e 40 ng Fe usando 20 μ L de H₂SO₄ 1% como modificador químico. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização.

Como os três ácidos apresentaram resultados bastante satisfatórios, optou-se por realizar um estudo comparativo entre eles, com o objetivo de verificar qual deles seria mais apropriado para as amostras. Durante o estudo do uso de ácidos inorgânicos como modificadores químicos, verificou-se a possibilidade de reduzir o tempo de atomização, já que os sinais analíticos de Cr e Fe, para padrão e amostra, retornavam à linha de base antes de 6 segundos com a adição dos três ácidos. Conseqüentemente, o tempo de atomização foi reduzido para 6 s, com o objetivo de preservar o forno e a plataforma de grafite.

Assim, primeiramente, foram comparados os perfis dos sinais analíticos de Cr e Fe da amostra MV1 e da solução padrão, gerados com os três ácidos. Para isso, os sinais bidimensionais foram sobrepostos, conforme mostrado nas Figuras 15 e 16, para a solução padrão e amostra MV1, respectivamente.

Na Figura 15, observa-se que os perfis gerados com HCl e HNO₃ apresentam um pequeno ombro, inexistente quando H₂SO₄ é utilizado. Portanto, com o uso desse último ácido, foi obtido o perfil mais simétrico de Cr na solução padrão.

Outro fator importante são os valores de A_{int} obtidos adicionando cada ácido, já que um dos objetivos da otimização do método é obter a maior sensibilidade possível. Dessa forma, foram comparados os valores de A_{int} obtidos para Cr com a adição dos três ácidos. Esse teste foi realizado em triplicata, sendo feita a média das absorvâncias obtidas em cada replicata. Os valores de A_{int} obtidos

foram de $0,080 \pm 0,0028$, $0,083 \pm 0,0040$ e $0,099 \pm 0,0013$, para a solução padrão de 350 pg de Cr com a adição de HCl, HNO₃ e H₂SO₄, respectivamente, sendo o valor de A_{int} obtido com a adição de H₂SO₄ em torno de 20% maior se comparado com a adição dos outros ácidos.

Um terceiro fator a ser considerado é a precisão dos resultados, expressa através do RSD. Nesse caso, os valores de RSD foram de 3,5, 4,8 e 1,3% com a adição de HCl, HNO₃ e H₂SO₄, respectivamente, mostrando que os resultados obtidos com a adição de H₂SO₄ são os mais precisos.

Para Fe, um comportamento semelhante foi observado, com pequenos ombros presentes nos perfis dos sinais analíticos gerados utilizando HCl e HNO₃. Também foram observados valores mais altos de A_{int} quando H₂SO₄ foi adicionado à solução padrão 40 ng Fe (valores de A_{int} de $0,049 \pm 0,0020$, $0,054 \pm 0,0013$ e $0,062 \pm 0,00083$ obtidos com a adição de HCl, HNO₃ e H₂SO₄, respectivamente, sendo o valor de A_{int} obtido com a adição de H₂SO₄ em torno de 25% maior se comparado com a adição dos outros ácidos). É importante ressaltar que, para Fe, os sinais analíticos gerados com HCl e HNO₃ não se apresentaram tão reprodutíveis quanto aqueles obtidos com H₂SO₄, isto é, foram observadas algumas oscilações na forma dos picos obtidos com esses ácidos entre as replicatas. Os valores de RSD obtidos foram de 4,2, 2,3 e 1,3% com a adição de HCl, HNO₃ e H₂SO₄, respectivamente.

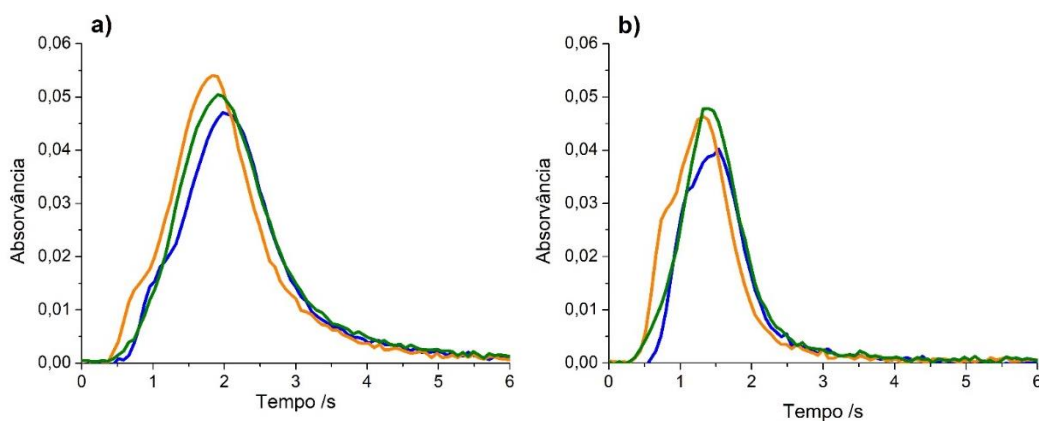


Figura 15. Perfis de pico para **a)** 350 pg Cr e **b)** 40 ng Fe com a adição de HCl (—), HNO₃ (—) e H₂SO₄ (—) 1% como modificadores químicos. $T_{pir} = 1300$ °C, $T_{atm} = 2600$ °C e fluxo de $0,1 \text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização.

Assim, considerando os perfis dos sinais analíticos, os valores de A_{int} e os valores de RSD obtidos para Cr e Fe na solução padrão com os três ácidos, concluiu-se que o ácido que apresentou os resultados mais satisfatórios foi o H_2SO_4 .

Na sequência, a mesma comparação foi realizada para a amostra MV1. Nesse caso, o teste foi realizado em quintuplicata, sendo as massas normalizadas para 0,05 mg e feita a média das absorvâncias obtidas em cada replicata.

Para os dois analitos, a simetria do perfil dos sinais analíticos para os três ácidos foi bastante similar, apesar de a amostra apresentar um pico mais alargado com a adição de HNO_3 , se comparado com os outros ácidos (Figura 16).

Para Cr, a sensibilidade foi quase 70% maior com a adição de H_2SO_4 , com um valor de A_{int} de $0,36 \pm 0,050$, quando comparado com os valores obtidos com a adição de HCl e HNO_3 ($0,20 \pm 0,042$ e $0,24 \pm 0,039$, respectivamente). Os valores de RSD obtidos foram de 20, 16 e 14%, com a adição de HCl, HNO_3 e H_2SO_4 , respectivamente.

Para Fe, foram observados resultados semelhantes aos obtidos para Cr na amostra MV1, com sensibilidade aproximadamente 35% maior obtida com a adição de H_2SO_4 ($0,44 \pm 0,045$), se comparado aos valores de A_{int} obtidos com a adição dos outros ácidos ($0,31 \pm 0,038$ e $0,32 \pm 0,034$, com a adição de HCl e HNO_3 , respectivamente).

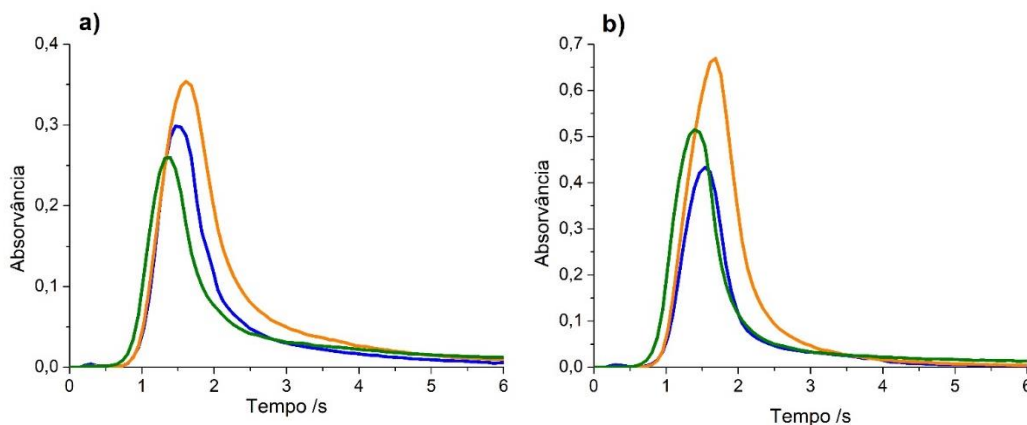


Figura 16. Perfis de pico para a) Cr e b) Fe para a amostra MV1 com a adição de HCl (—), HNO₃ (—) e H₂SO₄ (—) 1% como modificadores químicos. As massas de amostra pesadas para a adição de HCl, HNO₃ e H₂SO₄ foram, respectivamente, 0,061 mg, 0,072 mg e 0,063 mg. $T_{\text{pir}} = 1300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{atm}} = 2600 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de $0,1 \text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização.

De modo a ampliar esse estudo, a amostra MV2, que apresentava diferentes concentrações de Cr e Fe e uma matriz mais simples, também foi testada com a adição dos três ácidos. Nesse caso, as simetrias dos sinais analíticos para os três ácidos foram semelhantes e os valores de A_{int} obtidos com HCl, HNO₃ e H₂SO₄ apresentaram-se semelhantes entre si, com valores de A_{int} um pouco mais altos com a adição de HCl. Além disso, ressalta-se que a adição dos ácidos não alterou o perfil do sinal analítico para essa amostra, que já se apresentava simétrico mesmo sem a adição de modificadores químicos (Figura 4b).

Considerando o estudo realizado com os três ácidos inorgânicos, H₂SO₄ foi escolhido como modificador químico para prosseguir com o desenvolvimento do trabalho. A sensibilidade, os valores de RSD e, principalmente, a simetria obtida para os sinais analíticos de Cr e Fe para a solução padrão e para a amostra MV1 foram os fatores que levaram a essa decisão.

5.2.8. Estudo da concentração de modificador

Após a realização dos estudos para verificar qual modificador gerava os melhores resultados para a determinação simultânea de Cr e Fe em amostras

de suplementos alimentares, a concentração de H_2SO_4 a ser adicionada foi otimizada. A Figura 17 apresenta a influência de diferentes concentrações de H_2SO_4 nos valores de A_{int} de Cr e Fe na solução padrão e na amostra MV1.

Para isso, o volume de ácido foi mantido constante (20 μL) e variou-se a concentração da solução de H_2SO_4 adicionada sobre a solução padrão ou a amostra.

Considerando-se que a amostra apresentava valores de A_{int} consideravelmente maiores que os padrões que vinham sendo empregados optou-se por trabalhar com padrões mais concentrados (75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr e 8,0 mg L^{-1} Fe), sendo essas as concentrações usadas em todos os estudos seguintes. Assim, foi preparada uma nova solução padrão contendo 75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr e 8,0 mg L^{-1} Fe (a adição de 10 μL dessa solução resulta em 750 μg Cr e 80 ng Fe).

Conforme descrito anteriormente, algumas amostras apresentaram baixas concentrações dos analitos, sendo necessária a pesagem de uma massa elevada para a análise. Assim, volumes de modificador inferiores a 20 μL não eram suficientes para cobrir toda a massa amostral. Por outro lado, quando um volume maior era adicionado sobre a amostra, o conteúdo da plataforma transbordava. Desse modo, o volume de H_2SO_4 foi mantido em 20 μL .

Na Figura 17a, está apresentada a influência da concentração de H_2SO_4 adicionada sobre a solução padrão e a amostra MV1 nos sinais analíticos de Cr. Os resultados obtidos mostram poucas mudanças nos valores de A_{int} para as diferentes concentrações de ácido adicionadas na solução padrão e na amostra.

Entretanto, observa-se que houve um aumento no valor de A_{int} , da amostra MV1, com a adição de 20 μL de H_2SO_4 1%, sendo esse não significativo se o desvio padrão (do inglês, *standard deviation* - SD) for considerado. Além disso, observa-se um decréscimo nos valores de A_{int} de Cr para a solução padrão, do ponto sem adição de ácido para o ponto que conta com a adição de 20 μL de H_2SO_4 0,05%, provavelmente ocasionado pelo perfil de pico um pouco mais alargado quando não foi adicionado o ácido. Considerando os perfis de Cr, podendo ser observados os sinais analíticos da amostra MV1 com a adição de 20 μL H_2SO_4 0,05% e 1% nas Figuras 18a e b, respectivamente, não foram observadas mudanças significativas com a adição das três diferentes concentrações de ácido. Assim, avaliando os valores de A_{int} e os perfis obtidos

para Cr, concluiu-se que as três concentrações de H_2SO_4 poderiam ser utilizadas.

Na figura 17b, está apresentada a influência da concentração de H_2SO_4 adicionada sobre a solução padrão e a amostra MV1 nos sinais analíticos de Fe. É possível observar que, para a amostra MV1, os valores de A_{int} obtidos na ausência de ácido ou quando se adicionou 20 μL da solução H_2SO_4 0,05% é consideravelmente maior que o valor de A_{int} obtido com a adição de 20 μL da solução H_2SO_4 1%. Isso se deve à diferença nos perfis de Fe gerados. Sem ácido ou com a adição de H_2SO_4 0,05% (Figura 18a), os perfis apresentam-se muito alargados e assimétricos, enquanto para a segunda concentração (1% H_2SO_4), observa-se perfis simétricos e pouco alargados (Figura 18b). Essa diferença de perfil se reflete na área do pico e, conseqüentemente, no valor de A_{int} .

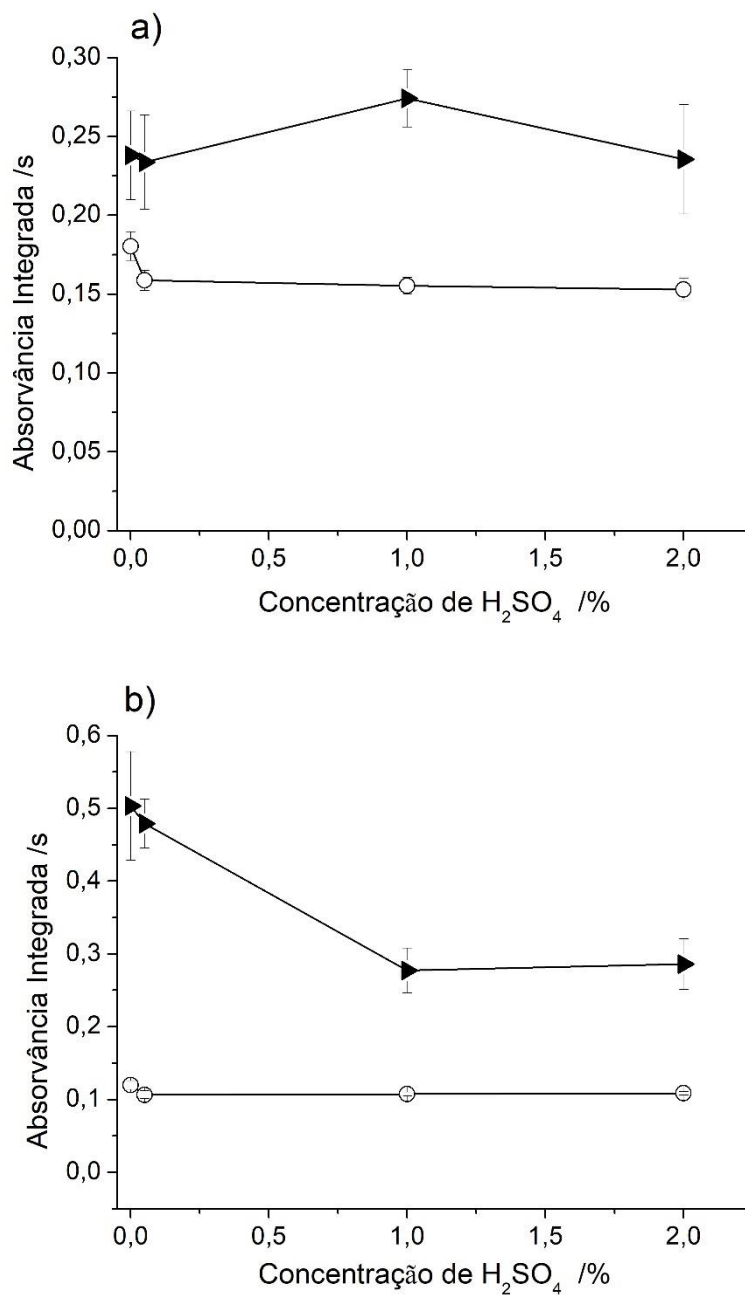


Figura 17. Estudo da influência da concentração de H₂SO₄ no sinal analítico de **a)** Cr e **b)** Fe para 10 µL da solução padrão com 750 pg Cr e 80 ng Fe (○) e para a amostra MV1 (►). T_{pir} = 1300°C e T_{atm} = 2600°C. Massas da amostra MV1 normalizadas para 0,05 mg. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n = 3 para solução padrão e n = 5 para amostra).

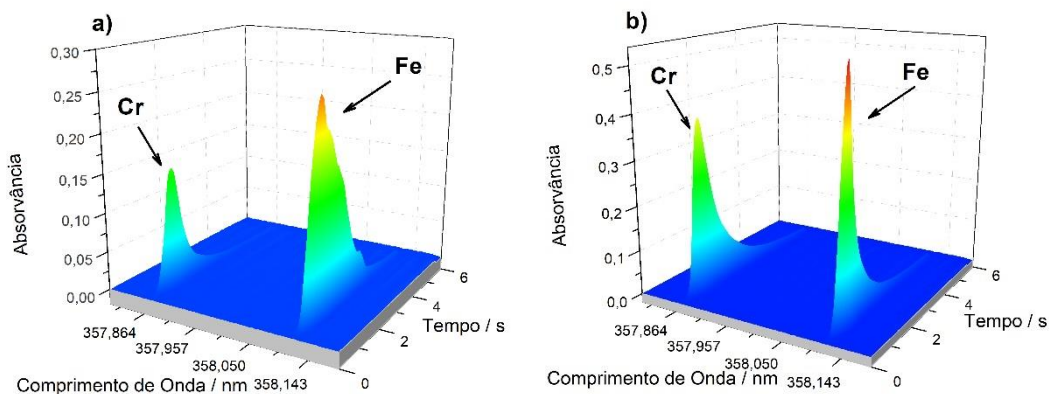


Figura 18. Espectros resolvidos no tempo para Cr e Fe obtidos *via* HR-CS GF AAS e análise direta da amostra MV1 usando **a)** 20 μL de H_2SO_4 0,05% ($m_{\text{MV1}} = 0,043$ mg) e **b)** 20 μL de H_2SO_4 1% ($m_{\text{MV1}} = 0,068$ mg) como modificador químico. $T_{\text{pir}} = 1300$ °C, $T_{\text{atm}} = 2600$ °C e fluxo de $0,1$ L min^{-1} Ar durante a etapa de atomização.

Considerando-se a diferença de perfil para o Fe, essa diferença nos perfis, supõe-se que a concentração de 0,05% de H_2SO_4 não é suficiente para eliminar os efeitos de matriz antes da etapa de atomização, sendo necessária uma maior concentração de ácido. Quanto às concentrações de 1% e 2% de H_2SO_4 , não foram observadas diferenças significativas tanto nos valores de A_{int} quanto nos perfis dos sinais analíticos de Fe. Dessa forma, as duas concentrações produziram resultados adequados para o estudo da amostra MV1.

Para a solução padrão, os valores de A_{int} não apresentaram variações entre diferentes concentrações de ácido adicionadas. Os perfis dos sinais analíticos também foram semelhantes para as três concentrações testadas. O mesmo foi observado quando não foi adicionado ácido, com perfis e valores de A_{int} também semelhantes.

Como na GF AAS, a simetria do sinal analítico é um fator essencial para a análise, a concentração de 0,05% de H_2SO_4 foi assim descartada. Foram, então, avaliadas as concentrações de 1 e 2% e, enfatizando a pequena diferença nos valores de A_{int} e nos perfis, tanto para Cr quanto para Fe, entre a adição das duas concentrações, foi escolhida a concentração de 1% de H_2SO_4 para o desenvolvimento do presente trabalho, com o objetivo de preservar a plataforma de grafite e o forno, já que durante o estudo observou-se que eles apresentavam

sinais de corrosão após algumas adições de ácido sendo essa mais intensa quando uma maior concentração de ácido era adicionada.

5.3. Curvas de pirólise e atomização

As Figuras 19 e 20 mostram a otimização das temperaturas de pirólise e atomização, respectivamente, obtidas para a determinação de Cr e Fe. Elas foram construídas para a solução padrão (750 pg Cr e 80 ng Fe) e para a amostra MV1, ambas utilizando 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. Para essa otimização, a temperatura de atomização foi fixada em 2600 °C e as temperaturas de pirólise avaliadas variaram de 600 °C a 1800 °C. Temperaturas menores que 600 °C não foram testadas devido à presença de fumaça para as amostras na etapa de atomização.

Para os resultados das temperaturas de pirólise nos sinais de Cr (Figura 18a), foram observados valores relativamente constantes de A_{int} de 600 °C até 1400 °C, levando em consideração os desvios padrões, para a solução padrão e para a amostra. Para temperaturas maiores que 1400 °C, houve uma diminuição no sinal analítico para a amostra, indicando que o analito começa a ser volatilizado na etapa de pirólise a partir dessa temperatura. Para o padrão, o Cr se mantém estável até 1600 °C.

Assim, analisando as curvas para a solução padrão e a amostra MV1, seria possível adotar como temperatura de pirólise, para o Cr, qualquer uma das temperaturas do patamar obtido entre 600 a 1400 °C.

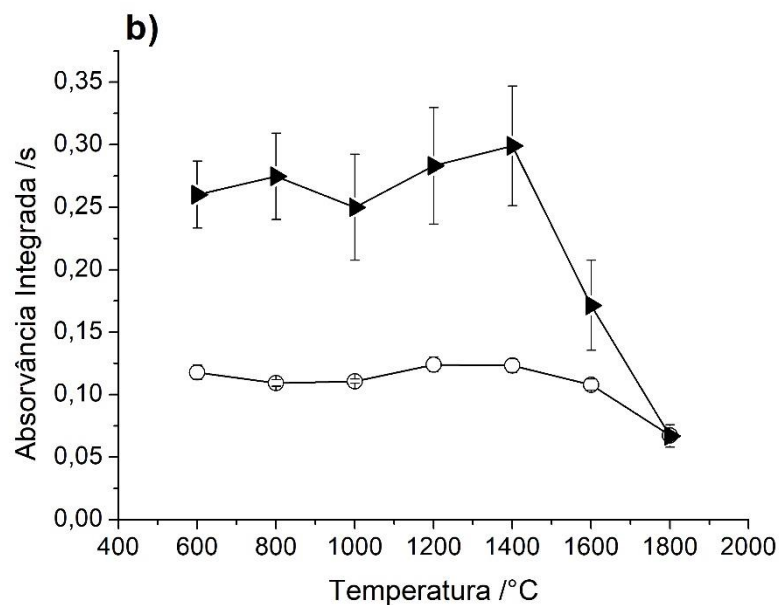
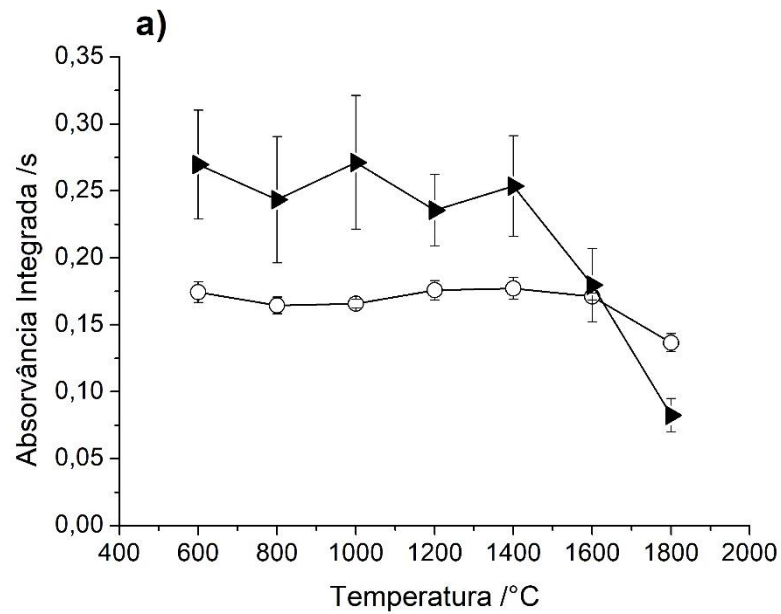


Figura 19. Curvas de pirólise para **a) Cr** e **b) Fe** para a amostra MV1 (►) e padrão com 750 pg Cr e 80 ng Fe (○) com 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. A massa da amostra MV1 foi normalizada para 0,05 mg. T_{atm} = 2600 °C e fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n = 3 para solução padrão e n = 5 para amostra).

Para garantir que as temperaturas de pirólise seriam adequadas para todas as amostras, já que o estudo contou com amostras com diferentes modos de comercialização e, portanto, matrizes completamente distintas entre si, três diferentes temperaturas de pirólise (800, 1200 e 1600 °C) foram avaliadas para as amostras MV2 e FI1. Essas amostras apresentaram valores de A_{int} , para Cr, muito semelhantes para as temperaturas investigadas, fazendo com que as três temperaturas pudessem ser escolhidas caso apenas esse fator fosse considerado.

Contudo, é importante destacar que, para a temperatura de 800 °C, foi observada fumaça na etapa de atomização tanto para a amostra MV2 quanto para amostra FI1, fato que evidencia que essa temperatura não foi efetiva para a completa eliminação da matriz presente nessas amostras. Dessa forma, as temperaturas abaixo de 800 °C puderam ser descartadas como possível escolha de temperatura de pirólise.

Para Fe, foi observado um comportamento semelhante ao obtido para Cr, para solução padrão e a amostra MV1 (Figura 19b), com valores de A_{int} constantes até 1400 °C e uma diminuição nesses valores para temperaturas maiores que 1400 °C. Para as amostras MV2 e FI1, as temperaturas de 800 e 1200 °C apresentaram valores similares de A_{int} , com uma queda nos valores na temperatura de 1600 °C.

Foi possível observar que, para Cr na amostra MV1, dentre as temperaturas de 1000, 1200 e 1400 °C, a temperatura de 1200 °C apresentou o menor desvio padrão. Para Fe, os desvios padrões obtidos para as três temperaturas foram muito semelhantes. Para Cr e Fe na solução padrão, os desvios padrões são pequenos para todas as temperaturas avaliadas.

Dessa forma, a temperatura de 1200°C foi escolhida como temperatura de pirólise para o desenvolvimento do presente trabalho, já que apresentou valores de A_{int} semelhantes às outras temperaturas testadas, um desvio padrão menor para Cr na amostra e não apresentou fumaça na etapa de atomização para as amostras MV2 e FI1.

Na sequência, foram construídas as curvas de atomização para a amostra MV1 e solução padrão (750 pg Cr e 80 ng Fe) também utilizando 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. A temperatura de pirólise foi fixada em 1200 °C e as temperaturas de atomização variaram de 2000 °C a 2600°C (Figura 20).

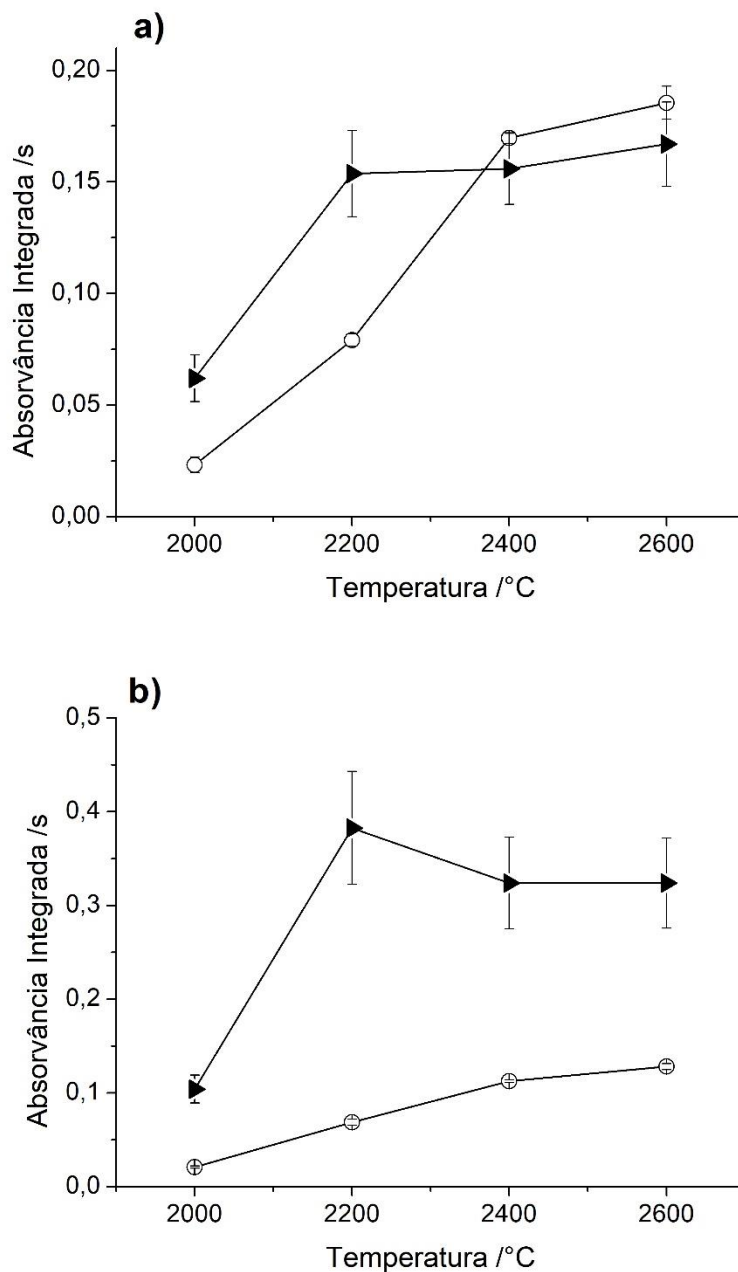


Figura 20. Curvas de atomização para **a) Cr** e **b) Fe** para a amostra MV1 (►) e solução padrão com 750 pg Cr e 80 ng Fe (○) com 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. A massa da amostra MV1 foi normalizada para 0,05 mg. T_{pir} = 1200 °C e taxa de fluxo de 0,1 L min⁻¹ Ar durante a etapa de atomização (n = 3 para solução padrão e n = 5 para amostra).

Os dois analitos apresentaram comportamentos similares para o padrão: aumento nos valores de A_{int} conforme as temperaturas aumentaram até 2600 °C. Já para a amostra é possível observar um platô entre as temperaturas de 2200

e 2600 °C, que demonstra que os valores de A_{int} são bastante semelhantes entre essas temperaturas. Tal comportamento somente mostrou-se um pouco diferente para o elemento Fe na amostra MV1, na temperatura de 2200 °C, que apresentou um valor mais elevado de A_{int} , provavelmente devido ao perfil do sinal analítico, que se apresentou muito alargado nessa temperatura, com o sinal analítico se estendendo até depois dos 6 segundos de tempo de integração. Entretanto, se os desvios padrões forem considerados, esse aumento na sensibilidade não é significativo.

Já que os efeitos das temperaturas de pirólise foram avaliados para as amostras MV2 e FI1, essas também foram avaliadas nas mesmas temperaturas de atomização que a amostra MV1 e padrão. O comportamento observado para Cr foi o mesmo evidenciado para a amostra MV1: com valores de A_{int} muito semelhantes desde a temperatura de 2200 até 2600°C. Para Fe, observou-se valores também semelhantes entre os valores de A_{int} obtidos utilizando as temperaturas de 2200 e 2400 °C. Entretanto, houve um aumento significativo na sensibilidade quando a temperatura de 2600 °C foi adotada, para as duas amostras.

Assim, para garantir que os analitos fossem totalmente atomizados, para que os melhores perfis de pico (mais simétricos) fossem obtidos e para garantir a maior sensibilidade, foi escolhida a temperatura de 2600 °C como temperatura de atomização. O programa de temperatura otimizado está apresentado na Tabela 2.

5.4. Estudo da influência da massa de amostra

O passo seguinte consistiu na avaliação da massa de amostra inserida na plataforma de grafite, de modo a verificar se diferentes massas de amostra teriam alguma influência sobre a linearidade de resposta.

Para avaliar a correlação entre as variáveis massa de amostra e a A_{int} obtida para Cr e Fe, diferentes massas das amostras MV1 e MV2 foram pesadas diretamente na plataforma de grafite, com a adição de 20 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) como modificador químico. A Figura 21 mostra as curvas obtidas para Cr e Fe nessas amostras.

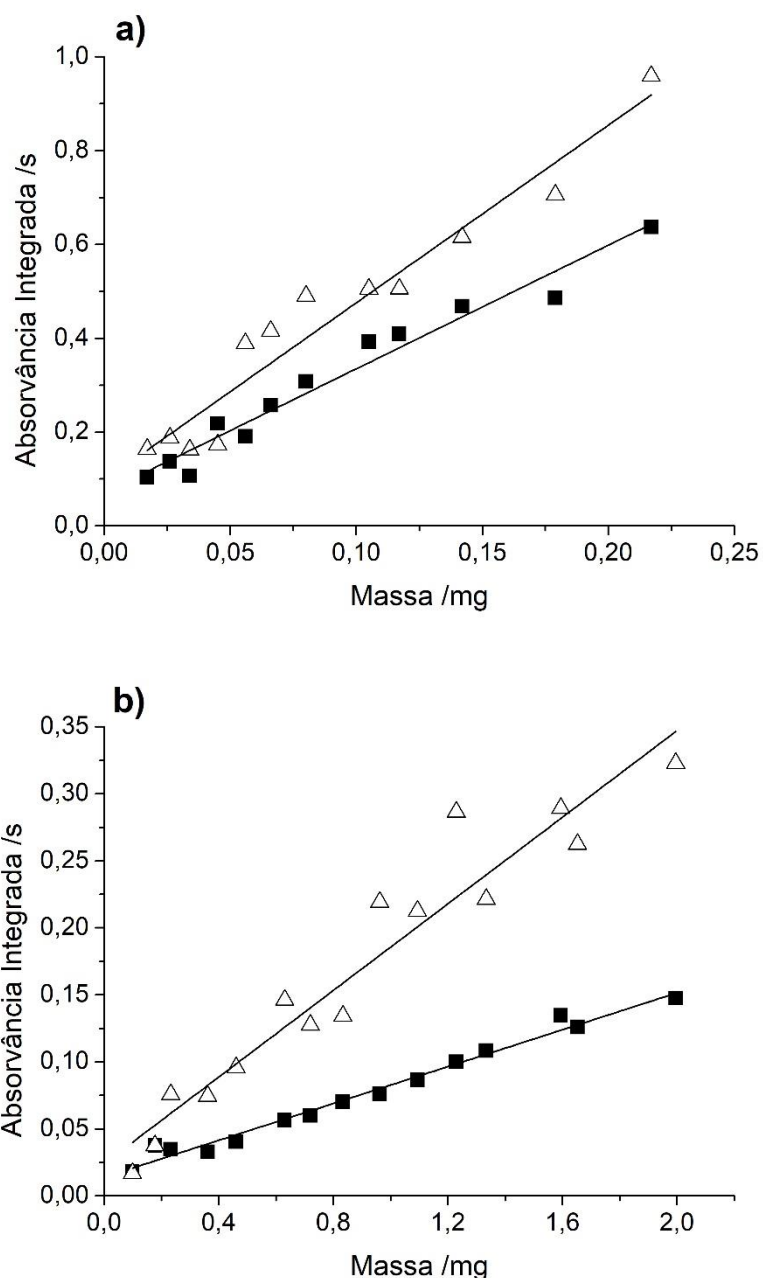


Figura 21. Influência da massa de amostra para **a)** MV1 e **b)** MV2 no sinal analítico de Cr (■) e Fe (△) com 20 μL de H_2SO_4 1% como modificador químico. $T_{\text{pir}} = 1200\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{atm}} = 2600\text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de $0,1\text{ L min}^{-1}$ Ar durante a etapa de atomização.

Devido às altas concentrações de Fe na amostra MV1, a massa máxima possível de ser analisada foi limitada pelo desvio da linearidade através da avaliação dos valores de A_{int} desse analito. Massas de amostra acima de 0,22 mg, aproximadamente, apresentaram desvios na linearidade. Assim, massas

entre 0,017 e 0,217 mg foram avaliadas (Figura 21a) e o coeficiente de correlação (R) para Cr e Fe foi, respectivamente, 0,9787 e 0,9665. Dessa forma, foi estabelecido que a massa máxima de amostra MV1 que poderia ser pesada seria de 0,22 mg.

Conforme descrito anteriormente, as concentrações de Cr e Fe presentes nas amostras eram muito variáveis, fazendo com que a quantidade de amostra a ser pesada também variasse, de uma amostra para outra.

Já que a maioria das amostras apresentavam menores concentrações dos analitos e, por isso, possibilitavam a adição de maiores massas à plataforma, também foi realizado um estudo de massa para a amostra MV2, adotando o mesmo procedimento utilizado para a amostra MV1. Massas de 0,098 a 2,0 mg foram pesadas, sendo a adição de maiores massas limitada pela capacidade da plataforma. A Figura 21b mostra as curvas obtidas para Cr e Fe na amostra MV2. Para essa amostra, o coeficiente de correlação (R) para Cr e Fe foi, respectivamente, 0,9906 e 0,9603.

A linearidade obtida para Cr e Fe nas duas amostras avaliadas demonstra que não há influência de matriz. Assim, considerando as diferentes amostras analisadas, a massa máxima de amostra possível de ser pesada nesse estudo foi de 2,0 mg.

5.5. Parâmetros de mérito

Como mencionado na seção de Procedimentos experimentais, de acordo com as diferentes concentrações de Cr e Fe presentes nas amostras, foram utilizadas diferentes condições experimentais (Tabela 3).

Todas as curvas de calibração foram construídas utilizando um branco como zero, que consistiu na adição de apenas o modificador químico (20 μL de H_2SO_4 1%) à plataforma de grafite, sendo ele submetido ao programa de aquecimento.

Para a condição 1, que contou com a presença de fluxo mínimo de Ar na etapa de atomização (0,1 L min^{-1}) e usou apenas CP para a avaliação dos sinais analíticos de Cr e Fe, oito soluções padrão aquosas multi-elementares foram empregadas para a construção da curva de calibração, nas faixas de concentração de 5,0 - 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (50 - 3000 pg) para Cr e 1,4 - 70,0 mg L^{-1} (14,0 - 700 ng) para Fe.

Para a variação da condição 1, que avaliou Fe utilizando os pixels -3/+3, foram utilizadas nove soluções padrão multi-elementares, com concentrações variando de 1,9 – 100 mg L⁻¹ (19,0 – 1000 ng) de Fe, além da medida do branco.

Para Cr e Fe na Condição 2, na qual o fluxo de Ar da etapa de atomização foi interrompido e utilizou CP ± 1 para a avaliação do sinal de Cr e apenas CP para a avaliação do sinal de Fe, foram utilizadas cinco soluções padrão multi-elementares com concentrações variando de 3,2 - 75,0 µg L⁻¹ (32,0 - 750 pg) para Cr e 0,4 – 15 mg L⁻¹ (4,0 - 150 ng) para Fe, sendo essa, portanto, a condição de maior sensibilidade. É importante ressaltar que a condição 2 para Fe não foi utilizada para quantificar nenhuma das amostras, já que foi possível realizar todas as quantificações usando apenas a condição 1. Entretanto, se as amostras apresentassem concentrações mais baixas de Fe e fosse necessária uma condição mais sensível para sua determinação, a condição 2 poderia ser utilizada.

Todas as curvas de calibração foram obtidas com a adição de 20 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) sobre as soluções padrão.

As equações de regressão linear, os coeficientes de correlação (R), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ) e massas características (m₀) obtidas para as condições experimentais estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de mérito obtidos para Cr e Fe utilizando duas diferentes condições experimentais *via* HR-CS GF AAS e a análise direta de amostras sólidas. 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. T_{pir} = 1200 °C e T_{atm} = 2600 °C.

Condição		Equação de Regressão Linear	R	LOD*	LOQ*	m ₀
1	Cr	Fluxo mín de Ar CP $A_{int} = 0,0002 + 0,0165m_{Cr}$ (pg)	0,9992	7,4 µg kg ⁻¹	25 µg kg ⁻¹	25 pg
	Fe	Fluxo mín de Ar CP $A_{int} = 0,0010 + 0,0232m_{Fe}$ (ng)	0,9985	2,1 mg kg ⁻¹	7,0 mg kg ⁻¹	4,4 ng
	Fe	Fluxo mín de Ar 3/+3 $A_{int} = 0,0004 + 0,0167m_{Fe}$ (ng)	0,9964	2,8 mg kg ⁻¹	9,4 mg kg ⁻¹	12 ng
2	Cr	Sem fluxo de Ar CP ± 1 $A_{int} = 0,0007 + 0,0468m_{Cr}$ (pg)	0,9958	4,8 µg kg ⁻¹	16 µg kg ⁻¹	6,6 pg
	Fe	Sem fluxo de Ar CP $A_{int} = 0,0025 + 0,0171m_{Fe}$ (ng)	0,9956	0,65 mg kg ⁻¹	2,2 mg kg ⁻¹	1,8 ng

*Calculado considerando a massa de amostras de 2,00 mg.

A partir dos resultados obtidos é possível comparar a massa característica obtida no presente trabalho, para o Cr na Condição 2, com o trabalho desenvolvido por Santos *et al.*⁵², já que os dois trabalhos utilizaram condições semelhantes (mesma linha analítica para Cr, 3 *pixels* para avaliação do sinal analítico e ausência de fluxo de Ar na etapa de atomização). Assim, a m_0 obtida para Cr no presente trabalho (6,6 pg) demonstra que o método aqui proposto é mais sensível que o desenvolvido por Santos *et al.*⁵² com m_0 de 13 pg.

Os parâmetros de mérito obtidos utilizando a condição 1 (tanto avaliando Cr e Fe com o *pixel* central quanto Fe com os *pixels* laterais), bem como a condição 2 para Fe não podem ser comparados diretamente com os relatos da literatura, uma vez que essas condições experimentais não foram previamente reportadas por outros autores, sendo o presente trabalho o primeiro a reportar tais condições.

Assim, através da análise da massa característica foi possível confirmar, conforme esperado, que a condição 2 é a mais sensível tanto para Cr ($m_0 = 6,64$ pg) quanto para Fe ($m_0 = 1,8$ ng), se comparada com a condição 1, cujas massas características são de 25 pg para Cr e 4,4 ng para Fe.

Para Fe, também se confirma que, a condição 1 que utilizou CP para avaliação do sinal analítico é mais sensível, se comparada à sua variação, que utiliza os *pixels* laterais -3/+3 para avaliação do sinal analítico, com massas características de 4,4 e 12 ng, respectivamente.

Tais observações evidenciam o efeito da presença de fluxo de Ar na etapa de atomização na redução da sensibilidade do método. Também evidenciam a possibilidade de alterar a sensibilidade do método através da variação do número de *pixels* usados para a avaliação dos sinais analíticos.

Como pode ser visto, o uso de um maior número de *pixels* resulta em uma melhora na sensibilidade do método, bem como o aumento da distância do *pixel* central (medida das asas - *pixels* laterais) implica em uma redução significativa na sensibilidade. Tais possibilidades confirmam, mais uma vez, a versatilidade da HR-CS GF AAS, tornando possível a determinação elementar em diversos tipos de amostra, com uma ampla faixa de concentração.⁷

Os valores de R obtidos para as curvas de calibração evidenciam a correlação entre a concentração dos analitos e os valores de A_{int} , demonstrada através da linearidade da curva.

A exatidão do método foi avaliada através da determinação da concentração de Cr e Fe no material de referência certificado SRM NIST 8415 *Whole Egg Powder*, sendo avaliada utilizando a condição 1 (fluxo mínimo de Ar na etapa de atomização e CP para a avaliação do sinal analítico de Cr e Fe) e com a adição de 20 µL de H₂SO₄ 1%. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Para comparar os valores encontrados com os valores certificados, foi utilizado o teste t-Welch para Cr ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$), quando as variâncias entre os resultados eram estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95% quando utilizando o teste-F.²⁷ Já para Fe, foi utilizado o teste *t-Student* ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$), a um nível de 95% de confiança. Assim, todos os resultados obtidos estão em concordância com os valores certificados.

Tabela 6. Determinação de Cr e Fe no SRM NIST 8415 *Whole Egg Powder* por HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos para avaliação da exatidão do método proposto. Utilizando a condição 1 e 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. T_{pir} = 1200 °C e T_{atm} = 2600 °C. (Média ± desvio padrão, n = 5).

NIST SRM 8415	Cr^a	Fe^b
Valores Encontrados	0,35 ± 0,027 mg kg ⁻¹	114,6 ± 7,46 mg kg ⁻¹
Valores Certificados	0,37 ± 0,18 mg kg ⁻¹	112 ± 16 mg kg ⁻¹
$t_{\text{crítico}}$	2,78	2,78
$t_{\text{calculado}}$	1,66	0,77

a Teste t-Welch
b Teste *t-Student*

A precisão do método foi expressa através do desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation* – RSD), conforme descrito na sessão 4.5.2, que variou de 5,0 a 19% para Cr e de 8,0 a 17% para Fe, valores que são adequados para a análise direta de amostras com matrizes complexas, sem preparo de amostra, de acordo com Kurfürst.^{46,57}

5.6. Aplicação do método

Após a determinação dos parâmetros de mérito do método, foram realizadas as análises das 10 amostras de suplementos alimentares utilizando as condições

experimentais previamente otimizadas. Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos para a quantificação de Cr e Fe em suplementos alimentares por HR-CS GF AAS, empregando a análise direta de sólidos bem como as concentrações desses analitos apresentadas nos rótulos das amostras comercializadas. Nas colunas que apresentam as concentrações de Cr e Fe apresentadas nos rótulos das amostras também está representada a tolerância de 20% para mais ou para menos permitida pela RDC N° 360 de 23 de dezembro de 2003. Assim, primeiramente os resultados obtidos foram comparados com as concentrações apresentadas nos rótulos das amostras.

Os rótulos das quatro amostras de FI não informam valores para Cr. Entretanto, para as amostras FI1 e FI2 esse elemento foi detectado, com concentração de $0,054 \pm 0,009$ e $0,017 \pm 0,001$ mg kg⁻¹, respectivamente, valores que não podem ser considerados como inexistentes no suplemento alimentar. Já para as amostras FI3 e FI4, não foi possível avaliar a concentração de Cr já que os valores estavam abaixo do LOD, indicando que o analito, se está presente encontra-se em concentrações muito baixas.

Para Fe nas amostras de FI, os valores encontrados foram maiores do que os informados no rótulo para as amostras FI2, FI3 e FI4. Foi aplicado um teste *t-Student* e verificou-se que os resultados obtidos para Fe nas 3 amostras são considerados estatisticamente diferentes dos valores apresentados no rótulo, a um nível de 95% de confiança ($t_{\text{calcFI2}} = 3,35$, $t_{\text{calcFI3}} = 7,83$, $t_{\text{calcFI4}} = 4,79$, sendo o $t_{\text{crítico}}$ para as três amostras 2,78).

Tabela 7. Concentrações de Cr e Fe apresentadas nos rótulos das amostras comercializadas, considerando os valores de tolerância (20% para mais ou para menos) permitidos pela RDC N° 360 (23 de dezembro de 2003)¹⁸ e concentrações obtidas através da determinação de Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares por HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos. Resultados obtidos utilizando as duas condições experimentais do método e 20 µL de H₂SO₄ 1% como modificador químico. T_{pir} = 1200 °C e T_{atm} = 2600 °C. (Média ± desvio padrão, n = 5).

Amostras	Concentração de Cr no Rótulo ± tolerância de 20% mg kg⁻¹	Concentração de Fe no Rótulo ± tolerância de 20% mg kg⁻¹	Concentração de Cr mg kg⁻¹	Concentração de Fe mg kg⁻¹
FI1	NI	62 ± 12,4	0,054 ± 0,009	34 ± 6,0
FI2	NI	60 ± 12	0,017 ± 0,001	76 ± 11
FI3	NI	51 ± 10,2	<LOQ	93 ± 12
FI4	NI	62 ± 12,4	<LOQ	92 ± 14
MV1	13,6 ± 2,72	6136 ± 1227,2	12,1 ± 1,45	4405 ± 492
MV2	0,2 ± 0,04	69 ± 13,8	0,14 ± 0,020	63 ± 4,6
MV3	0,2 ± 0,04	211 ± 42,2	0,078 ± 0,015	342 ± 43
MV4	31,8 ± 6,36	3181 ± 636,2	13,3 ± 0,470	5411 ± 966
MV5	45,4 ± 9,08	25454 ± 5090,8	17,5 ± 2,23	38193 ± 3406
MV6	NI	15873 ± 3174,6	1,38 ± 0,120	16545 ± 1878

*NI = Não informado.

As amostras de MV apresentaram resultados bastante diversificados para Cr e Fe. Para Cr, a amostra MV1 apresentou uma concentração condizente com aquela expressa no rótulo (estatisticamente iguais de acordo com teste *t-Student*, sendo $t_{\text{calc}} = 2,31$ e $t_{\text{crítico}} = 2,78$). As concentrações encontradas para Cr nas amostras MV2, MV3, MV4 e MV5, foram menores que as declaradas nos rótulos, sendo todas consideradas estatisticamente diferentes de acordo com teste *t-Student* para as amostras MV2 ($t_{\text{calc}} = 6,71$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$) e MV3 ($t_{\text{calc}} = 18,19$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$) e teste *t-Welch* para as amostras MV4 ($t_{\text{calc}} = 88,01$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$) e MV5 ($t_{\text{calc}} = 27,98$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$). Para a amostra MV6, não é apresentado o elemento Cr no rótulo, mas na análise foi possível quantificá-lo, resultando em uma concentração de $1,38 \pm 0,120 \text{ mg kg}^{-1}$, considerada bastante significativa.

Para Fe, as concentrações encontradas para as amostras MV1 ($t_{\text{calc}} = 7,87$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$), MV3 ($t_{\text{calc}} = 6,81$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$), MV4 ($t_{\text{calc}} = 5,16$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$) e MV5 ($t_{\text{calc}} = 8,36$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$) foram consideradas estatisticamente diferentes dos valores apresentados nos rótulos, de acordo com teste *t-Student*, a um nível de 95% de confiança. A amostra MV2 também apresentou resultados estatisticamente diferentes, sendo esse resultado obtido através de um teste *t-Welch* ($t_{\text{calc}} = 2,92$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$). A concentração de Fe encontrada para a amostra MV6 foi considerada estatisticamente igual ao valor apresentado no rótulo, de acordo com o teste *t-Student*, a um nível de 95% de confiança ($t_{\text{calc}} = 0,80$, $t_{\text{crítico}} = 2,78$).

Também foi realizada a comparação dos resultados obtidos com os limites estabelecidos pela ANVISA. Como os valores estabelecidos pela ANVISA são dados em limites máximos e mínimos diários e por faixa etária, a opção encontrada para a comparação entre os valores encontrados e os limites da ANVISA consistiu em simular qual seria o consumo diário de cada amostra, de acordo com a recomendação fornecida pelo fabricante, com relação a porção diária e faixa etária (Tabela 4).

Assim, a amostra MV2 será usada para explicar como o cálculo foi feito: todas as amostras apresentavam uma recomendação de quantidade diária do produto no seu rótulo. Como a amostra MV2 deve ser diluída em água, o fabricante recomenda o consumo de 70,0 g do produto para cada copo d'água e de 1 a 3 copos diários, conforme necessidade. Todos os cálculos foram realizados considerando a recomendação diária máxima do produto.

Portanto, a quantidade diária recomendada da amostra é de 210,0 g (70,0 g adicionadas a cada copo, sendo a recomendação máxima de 3 copos diários). Considerando que o resultado obtido para Cr para essa amostra foi de 0,14 mg em 1000 g, foi possível estimar quanto do analito estará presente em 210 g. O resultado, 0,0294 mg de Cr, consiste na quantidade de analito consumido diariamente, ou seja, 29,4 µg de Cr por dia. Esse valor está dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA para o consumo diário de Cr para a faixa etária na qual o produto se encaixa (≥ 19 anos).

Esses cálculos foram realizados para Cr e Fe em todas as amostras analisadas. Quando foram realizados em amostras comercializadas em cápsulas e comprimidos, a diferença nos cálculos foi apenas na recomendação diária fornecida pelo fabricante, que nesses casos recomenda um número de comprimidos e informa a massa desse comprimido.

Os valores máximos de consumo diário calculados para cada amostra estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Consumo máximo de Cr e Fe diário em cada amostra, obtido a partir das concentrações encontradas no presente trabalho e utilizando a recomendação máxima de consumo diário das amostras que cada fabricante recomenda.

Amostras	Cr (µg Cr/dia)	Fe (mg Fe/dia)
FI1	6,50	4,09
FI2	2,09	9,36
FI3	< LOD	14,26
FI4	< LOD	13,85
MV1	15,97	5,81
MV2	29,38	13,22
MV3	2,11	9,23
MV4	14,63	5,95
MV5	9,63	21,00
MV6	0,87	10,42

De acordo com os limites mínimos e máximos de consumo diário estabelecidos pela ANVISA, apresentados na Tabela 1, as amostras MV1 a MV5 apresentaram concentrações dentro dos limites estabelecidos para Cr e Fe. A amostra MV6 apresentou valores de Cr abaixo do limite mínimo estabelecido para a faixa etária pela ANVISA, entretanto, esse analito não consta no rótulo. Para Fe a amostra MV6 apresentou valores condizentes com os limites estabelecidos.

Para as amostras de fórmula infantil (FI), todas elas apresentaram valores abaixo do limite máximo estabelecido para a faixa etária para Fe. Como essas amostras apresentam variações na sugestão diária de consumo, também foram calculados os consumos diários levando em consideração o consumo mínimo sugerido de amostra. Para isso foi considerada a sugestão dos rótulos com o menor consumo do suplemento recomendado pelo fabricante. Dessa forma, os resultados mostraram que as amostras estão acima do limite mínimo de Fe que deve estar presente no suplemento alimentar, estabelecido pela ANVISA.

Para Cr, as amostras FI3 e FI4, cujos valores estão abaixo do LOQ do método desenvolvido, não puderam ser quantificadas. As amostras FI1 e FI2 apresentaram valores de Cr acima do limite máximo estabelecido pela ANVISA para a faixa etária (0 a 6 meses), considerando o consumo máximo de amostra recomendado pelo fabricante. Entretanto, vale ressaltar que os fabricantes citam que essas indicações não devem ser seguidas sem a recomendação de um profissional da área da saúde (médico ou nutricionista) que deve ser baseada na necessidade nutricional do bebê.

6. Sugestão de estudos futuros

O objetivo principal desse trabalho consistiu no desenvolvimento de um método que permitisse a quantificação da concentração total de Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares.

No entanto, quando um determinado elemento é ingerido, ele é primeiramente liberado da matriz do suplemento para, então, dependendo de diversos fatores, ser absorvido através do epitélio intestinal e atingir o sistema circulatório, quando então pode exercer os efeitos benéficos/tóxicos. Portanto, deve-se considerar ainda que na análise de suplementos, a determinação do teor total desses elementos químicos não proporciona informações suficientes sobre os efeitos que essas espécies podem provocar em humanos, através do consumo. Um fator a ser considerado é a bioacessibilidade do nutriente, que corresponde a fração que é liberada da matriz do alimento pelo trato gastrointestinal e torna-se disponível para ser absorvida.⁶⁵

Assim, como estudos futuros, sugere-se a realização de ensaios para avaliar a bioacessibilidade de Cr e Fe para verificar, realmente, a concentração de cada analito que é consumida pelo corpo humano.

7. Conclusões

O método analítico desenvolvido demonstrou ser eficiente para a determinação de Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares com matrizes bastante distintas. A possibilidade de realizar a análise direta, sem a necessidade do uso de procedimentos complexos de preparo de amostra, reduziu o tempo da análise, eliminou o uso de reagentes concentrados e reduziu significativamente a geração de resíduos.

Os modificadores químicos, comumente citados na literatura para a determinação de Cr e Fe (Pd, Mg e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), não foram eficientes para contornar os efeitos de matriz. Na tentativa de solucionar esses problemas, foram estudados diferentes ácidos inorgânicos (HCl, HNO_3 e H_2SO_4), substâncias que não são usualmente empregadas como modificadores químicos. Tais ácidos foram capazes de eliminar as interferências de matriz, sendo apropriados para a determinação simultânea de Cr e Fe. Na sequência foi realizado um estudo para verificar qual deles gerava os melhores resultados. Assim, o H_2SO_4 1% foi escolhido como modificador químico.

As características únicas da HR-CS GF AAS, que permitem o uso de diferentes *pixels* para a avaliação do sinal analítico, além da presença ou ausência da vazão de Ar na etapa de atomização, possibilitaram que a determinação simultânea de elementos presentes em faixas de concentração tão distintas fossem quantificadas através do uso de diferentes condições instrumentais.

Assim, o método desenvolvido para determinação simultânea de Cr e Fe permitiu a análise direta de amostras de suplementos alimentares por HR-CS GF AAS e as concentrações encontradas foram comparadas com as apresentadas no rótulo das amostras comercializadas e com os limites estabelecidos pela ANVISA, em 2018, para suplementos alimentares.

8. Referências

1. Molin, T.R.D.; Leal, G.C.; Müller, L.S.; Muratt, D.T.; Marcon, G.Z; Carvalho, L.M.; Viana, C. Regulatory framework for dietary supplements and the public health challenge. *Revista de Saúde Pública*, **2019**, 53, 90.
2. Smichowski, P.; Londonio, A. The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: A review. *Microchemical Journal*, **2018**, 136, 113.
3. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 243, de 26 de julho de 2018. **2018**, ANVISA.
4. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 28, de 26 de julho de 2018. **2018**, ANVISA.
5. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA – IN Nº 76, de 5 de novembro de 2020. **2020**, ANVISA.
6. Krug, F.J.; Rocha, F.R.P. Métodos de preparo de Amostras para análise elementar. EditSBQ: São Paulo, **2016**, 58.
7. Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U. High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry. 1st ed. Wiley – VCH: Weinheim, **2005**.
8. Resano M.; Aramendía M.; Belarra M.A. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: a tutorial review. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2014**, 29, 2229.
9. Rocco, A.; Donati, E.; Touloupakis, E.; Aturki, Z. Miniaturized separation techniques as analytical methods to ensure quality and safety of dietary supplements. *Trends in Analytical Chemistry*, **2018**, 103, 156.
10. García-Rico, L.; Leyva-Perez, J.; Jara-Marini, M.E. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico. *Food Chem Toxicol*, **2007**, 45, 1599.
11. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Suplementos alimentares: Documento de base para discussão regulatória. **2017**, ANVISA.

12. Soriano, S.; Netto, A.D.P.; Cassella, R.J. Determination of Cu, Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in multivitamin/multimineral dosage forms or tablets after an acidic extraction. *J Pharm Biomed Anal.* **2007**; 43, 304.
13. Gagnier, J.J. Evidence-informed management of chronic low back pain with herbal, vitamin, mineral, and homeopathic supplements. *The Spine Journal*, **2008**, 8, 70.
14. Tokalioglu, S.; Clough, R.; Foulkes, M.; Worsfold P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. *Food Chemistry*, **2014**, 150, 321.
15. O'Dell, B.L.; Sunde, R. Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. New York: Marcel Dekker, **1997**.
16. Singh, V.; Garg, A.N. Availability of essential trace elements in Indian cereals , vegetables and spices using INAA and the contribution of spices to daily dietary intake. *Food Chemistry*, **2006**, 94, 81.
17. Bu, K.; Cizdziel, J.V.; Reidy, L. Analysis of herbal supplements for selected dietary minerals and trace elements by laser ablation - and solution-based ICPMS. *Microchemical Journal*, **2013**, 106, 244.
18. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC N° 360, de 23 de dezembro de 2003. **2003**, ANVISA.
19. Anderson, R. Chromium as an Essential Nutrient for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **1997**, 26, S35.
20. Marrero, J.; Rebagliati, R.J.; Leiva, E.; Londonio, A.; Smichowski, P. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: Are the concentrations declared in the labels accurate? *Microchemical Journal*, **2013**, 108, 81.
21. Mulware, S.J. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech*, **2013**, 3, 85.
22. Pechova, A.; Pavlata, L. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina*, **2007**, 52, 1.
23. Martínez-Navarrete, N.; Camacho, M.M.; Martínez-Lahuerta, J.; Martínez-Monzó, J.; Fito, P. Iron deficiency and iron fortified foods - a review. *Food Res Int.*, **2002**, 35, 225.

24. Soetan, K.O.; Olaiya, C.O.; Oyewole, O.E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*, **2010**, 4, 200.
25. Soltyk, K.; Lozak, A.; Ostapczuk, P.; Fijalek, Z.; Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2003**, 32, 425.
26. Skoog, D. A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Couch, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*, 8 ed., Cengage Learning, São Paulo, Brasil, **2013**.
27. Nölte J. *ICP Emission Spectrometry: A Practical Guide*. Wiley-VCH: Weinheim, **2003**.
28. Zachariadis, G.A.; Olympiou, A.F. Use of slurry suspension sample introduction technique in fast multielement analysis of multimineral and multivitamin formulations by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, **2008**, 47, 541.
29. Avula, B.; Wang, Y.H.; Duzgoren-Aydin, N.S.; Khan, I.A. Inorganic elemental compositions of commercial multivitamin/mineral dietary supplements: Application of collision/reaction cell inductively coupled-mass spectroscopy. *Food Chemistry*, **2011**, 127, 54.
30. Krejčová, A.; Ludvíková, I.; Černohorský, T.; Pouzar, M. Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. *Food Chemistry*, **2012**, 132, 588.
31. Udousoro, I.; Ikem, A.; Akinbo, O.T. Content and daily intake of essential and potentially toxic elements from dietary supplements marketed in Nigeria. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2017**, 62, 23.
32. Tumir, H.; Bošnjir, J.; Vedrinar-Dragojevic, I.; Dragun, Z.; Tomic, S.; Puntaric, D.; Jurak, G. Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplements on the Croatian market. *Food Control*, **2010**, 21, 885.
33. Welz, B.; Vale, M.G.R.; Borges, D.L.G.; Heitmann, U. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 389, 2085.
34. Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed. Wiley-VCH: Weinheim, **1999**.

35. Fick, S. Identificação e correção de interferências espectrais na determinação de Pb em amostras de pó de estrada usando análise direta de sólidos e espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite. – Dissertação de Mestrado, UFRGS, **2018**.
36. Schlemmer, G.; Welz, B. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta*, **1986**, 41B, 1157.
37. Koirtjohann, S.R. A history of atomic absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta*, **1980**, 35B, 663.
38. Hieftje, G.M. Atomic Absorption Spectrometry-Has it Gone or Where is it Going? *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1989**, 4, 117.
39. Welz, B.; Borges, D.L.G.; Lepri, F.G.; Vale, M.G.R.; Heitmann, U. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - An analytical and diagnostic tool for trace analysis. *Spectrochim Acta - Part B*, **2007**, 62, 873.
40. Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; Weiße, R. Influence of the spectral bandwidth of the spectrometer on the sensitivity using continuum source AAS. *Fresenius J Anal Chem*, **1996**, 355, 300.
41. Welz, B.; Vale, M.G.R.; Florek, S.; Okruss, M.; Huang, M.D.; Becker-Ross, H. High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry-Theory and Applications. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, **2010**, 1, 34.
42. Welz, B.; Morés, S.; Carasek, E.; Vale, M.G.R.; Okruss, M.; Becker-Ross H. High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry - A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, **2010**, 45, 327.
43. Heitmann, U.; Welz, B.; Borges, D.L.G.; Lepri, F.G. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta - Part B*, **2007**, 62, 1222.
44. dos Santos, L.O.; Brandao, G.C.; dos Santos, A.M.P.; Ferreira, S.L.C.; Lemos, V.A. Direct and Simultaneous Determination of Copper and Iron in Flours by Solid Sample Analysis and High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food Anal. Methods*, **2016**, 10, 469.

45. Resano, M.; Rello, L.; Flórez, M.; Belarra, M.A. On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines. *Spectrochim Acta - Part B*, **2011**, 66, 321.
46. Dittert, I.M.; Silva, J.S.A.; Araujo, R.G.O.; Curtius, A.J.; Welz, B.; Becker-Ross, H. Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*, **2009**, 64, 537.
47. Virgilio, A.; Nóbrega, J.A.; Rêgo, J.F.; Neto, J.A.G. Evaluation of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct determination of chromium in medicinal plants. *Spectrochim Acta - Part B*, **2012**, 78, 58.
48. Krawczyk, M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2014**, 88, 377.
49. Adolfo, F.R.; do Nascimento, P.C.; Leal, G.C.; Bohrer, D.; Viana, C.; de Carvalho, L.M.; Colim, A.N. Simultaneous determination of iron and nickel as contaminants in multimineral and multivitamin supplements by solid sampling HR-CS GF AAS. *Talanta*, **2019**, 195, 745.
50. Zvěřina, O.; Kuta, J.; Coufalík, P.; Kosečková, P.; Komárek, J. Simultaneous determination of cadmium and iron in different kinds of cereal flakes using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, **2019**, 298, 125084.
51. Adolfo, F.R.; do Nascimento, P.C.; Leal, G.C.; Bohrer, D.; Viana, C.; de Carvalho, L.M. Simultaneous determination of Fe and Ni in guarana (*Paullinia cupana* Kunth) by HR-CS GF AAS: Comparison of direct solid analysis and wet acid digestion procedures. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2020**, 88, 103459.
52. Santos, A.S.; de Souza, C.T.; Leao, D.J.; Correia, F.O.; Almeida, T.S.; Ferreira, S.L.C. Simultaneous Determination of Chromium and Iron in Powdered Milk Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food Analytical Methods*, **2020**, 13, 284.

53. Coufalík, P.; Uher, A.; Zvěřina, O.; Komárek, J. Determination of cadmium in lichens by solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GF-AAS). *Environ Monit Assess*, **2020**, 192, 222.
54. Silvestre, D.M.; Nomura, C.S. Direct determination of potentially toxic elements in rice by SS-GF AAS: Development of methods and applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 6299.
55. Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins C.H.; Jardim, I.C.S.J.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, **2004**, 27, 771.
56. INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos – Documento de caráter orientativo. **2020**, INMETRO.
57. Kurfürst, U. Solid sample analysis: direct and slurry sampling using GFAAS and ETV-ICP. Ed Springer: Berlin, **1998**.
58. Boschetti, W.; Orlando, M.; Dullius M.; Dessuy, M.B; Vale, M.G.R.; Welz, B., Andrade, J.B. Sequential and simultaneous determination of four elements in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic and molecular absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom*, **2016**,31, 1269.
59. Silva, A.S.; Brandao, G.C.; Matos, G.D.; Ferreira, S.L.C. Direct determination of chromium in infant formulas employing high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and solid sample analysis. *Talanta*, **2015**, 144, 39.
60. Mattiazzi, P.; Bohrer, D.; Becker, E.; Viana, C.; Nascimento, P.C.; Carvalho, L.M. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for screening elemental impurities in drugs to adhere to the new international guidelines. *Talanta*, **2019**, 197, 20.
61. Acar, O. Determination of lead, chromium, manganese and zinc in slurries of botanical and biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using tungsten-containing chemical modifiers. *Microchim Acta.*, **2005**, 151, 53.
62. Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, J.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A. Usefulness of the chemical modification and the multi-injection technique approaches in the electrothermal atomic absorption spectrometric determination of silver, arsenic, cadmium, chromium,

mercury, nickel and lead in sea-water. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1998**, 13, 777.

63. Ajtony, Z.; Bencs, L.; Haraszi, R.; Szigeti, J.; Szoboszlai, N. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **2007**, 71, 683.
64. Frech, W.; Cedergren, A. Investigations of reactions involved in flameless atomic absorption procedures: Part III. A study of factors influencing the determination of lead in strong sodium chloride solutions. *Analytica Chimica Acta.*, **1977**, 88, 57.
65. Carbonell-Capella, J.M.; Buniowska, M.; Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frígola, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2014**, 13, 155.