

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

JULIANA CRISTINA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR DE Cd, Cr E Fe EM AMOSTRAS DE
SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

JULIANA CRISTINA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR DE Cd, Cr E Fe EM AMOSTRAS DE
SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof^a. Dr^a. Morgana Bazzan Dessuy

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Lisia Maria Gobbo dos Santos

Coorientadora

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Juliana Cristina da
Avaliação dos parâmetros de mérito de um método analítico para determinação multielementar de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares / Juliana Cristina da Silva. -- 2023.

49 f.

Orientadora: Morgana Bazzan Dessuy.

Coorientadora: Lisia Maria Gobbo dos Santos.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Bacharelado em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Cádmio. 2. Cromo. 3. Ferro. 4. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite. 5. Suplementos alimentares. I. Dessuy, Morgana Bazzan, orient. II. Santos, Lisia Maria Gobbo dos, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Cristina da Silva

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR DE Cd, Cr E Fe EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino "Trabalho de Conclusão de Curso – QUI" do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof^a. Dr^a. Morgana Bazzan Dessuy
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Lisia Maria Gobbo dos Santos
Coorientadora

Aprovada em: Porto Alegre, 10 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Morgana Bazzan Dessuy
Instituto de Química - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Lisia Maria Gobbo dos Santos
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Márcia Messias da Silva
Instituto de Química - UFRGS

Prof. Dr. Klester dos Santos Souza
Instituto de Química - UFRGS

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Juarez Arlindo da Silva e Izaura Maria da Silva, meus irmãos Marcelo Juarez da Silva e Maurício Juarez da Silva pelo apoio em todos os momentos da minha vida e meu namorado Sidney Pereira Filho por dividir comigo a paixão pela química, pela ajuda e incentivo desde o vestibular até o final da graduação.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Morgana Bazzan Dessuy, pela oportunidade, conhecimento compartilhado, amizade, paciência e por toda ajuda prestada durante o trabalho.

À minha coorientadora Prof^a Dr^a. Lisia Maria Gobbo dos Santos, pela orientação, por toda ajuda e contribuições na finalização deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Análises de Traços (GAT - UFRGS) por me receberem toda contribuição no desenvolvimento deste trabalho; em especial ao Leandro Kolling pelos ensinamentos e conhecimento compartilhado, pela ajuda e as sugestões dadas ao meu trabalho; ao Leandro dos Santos (Léo) pela contribuição no decorrer do trabalho, pela transmissão do conhecimento e por toda ajuda quando surgiam dúvidas e à Odiane Cunha toda ajuda e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os meus amigos que sempre torceram por mim e entenderam minha ausência em muitos momentos durante a graduação.

“Bem, tecnicamente, a Química é o estudo da matéria. Mas prefiro ver isso como o estudo da mudança. Mas isso é tudo na vida, certo? É o crescimento, então, a decadência, depois, a transformação. É fascinante, realmente.”

Walter White

(*Breaking Bad*)

RESUMO

Neste trabalho foram estabelecidos os parâmetros de mérito precisão, exatidão, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para um método analítico previamente desenvolvido para determinação multielementar de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e amostragem direta de sólidos. Os valores obtidos de LOQ foram $6,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para Cd, $15,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para Cr e $2,5 \text{mg.kg}^{-1}$ para Fe. Estes valores contemplam tanto a IN N° 28, DE 26 DE JULHO DE 2018, quanto a Farmacopeia Brasileira no que diz respeito aos valores máximos permitidos destes analitos. A exatidão do método foi avaliada de duas maneiras: analisando um material de referência certificado e por comparação com um método de referência - decomposição ácida assistida por micro-ondas e determinação por espectrometria de absorção atômica com fonte de linha e forno de grafite. Em ambos os casos foi constatado que as concentrações encontradas para os analitos são estatisticamente iguais as concentrações certificadas ou obtidas pelo método de referência, evidenciando que o método proposto é exato e pode ser utilizado para a determinação de Cd, Cr e Fe em suplementos alimentares. A precisão foi avaliada e os valores de RSD ficaram dentro da faixa aceitável para análise de traços, com exceção às amostras que tiveram RSD superior a 20% e isso se deve à heterogeneidade natural desse tipo de matriz. Posteriormente, o método foi aplicado para 10 amostras de suplementos alimentares. As concentrações variaram entre $33,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a $120,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para Cd, $0,28 \text{mg.kg}^{-1}$ a $17,64 \text{mg.kg}^{-1}$ para Cr, $20,81 \text{mg.kg}^{-1}$ a $16,48 \text{g.kg}^{-1}$ para Fe. Por fim, foi feita a análise de rotulagem e foi verificado que todos os suplementos estudados apresentam concentrações de Cr e Fe dentro dos limites seguros, porém algumas amostras apresentaram concentrações abaixo da recomendação mínima desse componente em suplementos alimentares. Já para Cd todas amostras apresentaram concentrações de Cd abaixo do limite máximo permitido desse metal, de $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$, pela Farmacopeia Brasileira.

Palavras-chave: cádmio; cromo; ferro; espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite; análise direta de sólidos; suplementos alimentares.

ABSTRACT

In this work, the figure of merit accuracy, precision, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were established for an analytical method previously developed for the multi-element determination of Cd, Cr, and Fe in dietary supplement samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. The obtained LOQ values were $6.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for Cd, $15.9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for Cr, and $2.5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for Fe. These values comply with both the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) Resolution No. 28, of July 26th, 2018, and the Brazilian Pharmacopeia regarding the maximum permitted values of these metals. The accuracy of the method was evaluated in two ways: by analyzing a certified reference material and by comparison with a reference method - microwave-assisted acid decomposition and determination by atomic absorption spectrometry with line source and graphite furnace. In both cases, the concentrations found for the analytes are statistically equal to the certified concentrations or obtained by the reference method, showing that the proposed method is accurate and can be used for the determination of Cd, Cr, and Fe in dietary supplements. Precision was evaluated, and the RSD values were within an acceptable range for trace analysis, except for samples that had an RSD higher than 20%, which is due to the natural heterogeneity of this type of matrix. Subsequently, the method was applied to 10 food supplement samples. The concentrations ranged from $33.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ to $120.7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for Cd, $0.28 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to $17.64 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for Cr, and $20.81 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to $16.48 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for Fe. Finally, a labeling analysis was performed, and it was found that all the studied supplements presented Cr and Fe concentrations within safe limits, but some samples presented concentrations below the minimum recommendation for dietary supplements. Regarding Cd, all samples presented concentrations below the maximum allowed limit of $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, according to the Brazilian Pharmacopeia.

Keywords: cadmium; chromium; iron; high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry; direct analysis of solids; dietary supplements.

LISTA DE SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CP: Pixel central (do inglês, *Center Pixel*)

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

HR-CS GF AAS: Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua e forno de grafite (do inglês, *High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)

F AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

ICP MS: Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente

ICP OES: Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente

LOD: Limite de Detecção (do inglês, *Limit of Detection*)

LOQ: Limite de Quantificação (do inglês, *Limit of Quantification*)

LS-GF AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com fonte de linha e forno de grafite (do inglês, *Line Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)

m_0 : Massa característica

MW-AD: Digestão assistida por radiação micro-ondas (do inglês, *Microwave Assisted Digestion*)

NIST: National Institute of Standards and Technology

PTFE: Politetrafluoretileno

R^2 : Coeficiente de determinação

RSD: Desvio padrão relativo (do inglês, *Relative Standard Deviation*)

SD: Desvio padrão (do inglês, *Standard Deviation*)

SRM: Material de Referência Padrão (do inglês, *Standard Reference Material*)

Ta: Temperatura de atomização

Tp: Temperatura de pirólise

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de publicações que contêm as palavras-chave <i>dietary supplements; dietary supplements and metal; dietary supplements and metal and atomic spectrometry</i> . Pesquisa realizada no dia 24 de março de 2023.	20
Figura 2 - Número de publicações que contêm as palavras-chave <i>dietary supplements and metal; dietary supplements and metal and atomic spectrometry</i> . Pesquisa realizada no dia 24 de março de 2023.	20
Figura 3 - Configuração de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite	22
Figura 4 - Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança da linha analítica de cádmio. Tp: 700 °C; Ta: 1700 °C	23
Figura 5 - Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança das linhas analíticas de cromo e ferro em um padrão. Tp: 1700 °C; Ta: 2600 °C.....	24
Figura 6 - Amostra do polivitamínico (PV03) que passou pelo processo de trituração no micro moinho.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programa de aquecimento para a digestão das amostras de suplementos alimentares.....	32
Tabela 2 - Programa de aquecimento para a descontaminação dos frascos de PTFE	32
Tabela 3 - Condições operacionais aplicadas nos métodos analíticos para a determinação de Cd, Cr e Fe	33
Tabela 4 - Programa de temperatura empregado na quantificação de Cd, Cr e Fe por LS-GF AAS.....	34
Tabela 5 - Programa de aquecimento para a determinação simultânea e sequencial de Cd, Cr e Fe, por HR-CS GF AAS	35
Tabela 6 - Faixa de trabalho empregada para as diferentes condições de medida utilizando a LS-GF AAS e de HR-CS GF AAS	36
Tabela 7 - Parâmetros de mérito de Cd, Cr e Fe obtidos pelas técnicas de LS-GF AAS e de HR-CS GF AA, utilizando as condições descritas na Tabela 6	38
Tabela 8 - Avaliação da exatidão utilizando o SRM NIST 1573a por HR-CS GF AAS (n = 4). t crítico = 3,28 para 95% de confiança e 3 graus de liberdade.	39
Tabela 9 - Resultados analíticos obtidos para determinação de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares por análise direta empregando a HR-CS GF AAS e por LS-GF AAS, após digestão em micro-ondas.....	40
Tabela 10 - Concentrações de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares, quantificadas por HR-CS GF AAS.....	43
Tabela 11 - Concentrações de Cd, Cr e Fe expressas como dose diárias calculadas a partir da dose diária recomendada no rótulo e os valores informados no rótulo	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Gerais.....	17
2.2	Específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	Suplementos alimentares e Legislação.....	18
3.2	Técnicas para a determinação de metais em suplementos alimentares	20
3.2.1	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite por análise direta de amostras sólidas	21
3.3	Parâmetros de mérito.....	24
3.3.1	Exatidão.....	24
3.3.2	Precisão.....	25
3.3.3	LOD	26
3.3.4	LOQ.....	27
3.3.5	Massa característica.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Instrumentos.....	29
4.2	Reagentes e materiais certificados	30
4.3	Procedimento Experimental	30
4.3.1	Amostras de suplementos	30
4.3.2	Digestão assistida por radiação micro-ondas	31
4.3.3	Medidas no espectrômetro de absorção atômica com fonte de linha e forno de grafite - Método de Referência.....	32
4.3.4	Medidas no espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e forno de grafite.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

5.1	Parâmetros de mérito.....	35
5.1.1	Limites de detecção, limites de quantificação e massa característica ...	35
5.1.2	Exatidão.....	39
5.1.3	Precisão.....	40
5.2	Comparação com a rotulagem	44
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Nutrientes específicos podem ser suplementados através do consumo de suplementos alimentares. Estes são normalmente destinados a indivíduos com deficiências em algum determinado nutriente. Uma boa alimentação e medicamentos específicos não devem ser totalmente substituídos por suplementos alimentares ou versões industrializadas prontas. No entanto, para aqueles que buscam aumentar a imunidade do corpo, esses suplementos oferecem uma solução segura e acessível. É importante destacar que um suplemento é destinado a completar, e não substituir, a dieta de uma pessoa.

O cádmio, o cromo e o ferro são elementos químicos que podem ser encontrados naturalmente no solo e em muitos alimentos. No entanto, em certas condições, esses elementos podem se apresentar em concentrações prejudiciais para a saúde humana, por isso, é importante monitorar a presença desses elementos em suplementos alimentares.

O cádmio é comumente encontrado em alimentos como frutos do mar, cereais integrais, batatas e vegetais de folhas verdes. No entanto, os níveis de cádmio em suplementos alimentares podem ser muito mais elevados do que os encontrados naturalmente nos alimentos. Isso ocorre porque muitos suplementos alimentares são feitos a partir de ingredientes que são processados e podem ser contaminados com cádmio durante o processo de produção. Além disso, alguns fabricantes de suplementos podem usar matérias primas que contenham cádmio em sua composição.

O cromo é encontrado naturalmente em muitos alimentos, como carne, peixe, cereais integrais e vegetais. Muitos suplementos alimentares contêm cromo para ajudar a regular o açúcar no sangue e melhorar a saúde metabólica. Portanto, a adição do cromo pode ser feita de forma proposital, no entanto deve seguir os limites estabelecidos pelas Instruções Normativas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O ferro é encontrado naturalmente em muitos alimentos, como carne vermelha, aves, peixe, feijões, lentilhas e vegetais de folhas verdes. Muitos suplementos alimentares contêm ferro para ajudar a prevenir a deficiência de ferro e anemia. No

entanto, a quantidade de ferro em suplementos alimentares pode variar muito, e alguns suplementos podem conter mais ferro do que o recomendado.

É importante investigar as concentrações destes analitos presentes nos suplementos. A Instrução Normativa - IN Nº 28, DE 26 DE JULHO DE 2018 estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares, determina os limites mínimos e máximos de Cr e Fe em suplementos alimentares, porém não apresenta os limites máximos de Cd. É importante ressaltar que a realização deste trabalho objetiva contribuir com informações relevantes sobre a presença de Cd em suplementos, o que pode auxiliar as autoridades competentes na criação de legislações que limitem a quantidade desse contaminante em suplementos. Além disso, os dados obtidos neste estudo poderão ser usados para avaliar as informações presentes nas rotulagens dos suplementos em relação aos teores de Cr e Fe. Também para a população em geral é essencial seguir as recomendações de dosagem e não exceder a dose diária recomendada.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Estabelecer os parâmetros de mérito de um método analítico desenvolvido para determinação multielementar de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares empregando a HR-CS GF AAS via análise direta de amostras sólidas e aplicá-lo em amostras reais.

2.2 Específicos

- Determinar os parâmetros de mérito do método desenvolvido: massa característica (m_0), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ);
- Avaliar a exatidão do método desenvolvido através da utilização de um material de referência padrão (SRM);
- Avaliar a exatidão comparando os resultados obtidos por HR-CS GF AAS, usando a técnica de análise direta, com os resultados obtidos por LS-GF AAS com a técnica de digestão ácida assistida por micro-ondas;
- Avaliar a precisão através do desvio padrão relativo;
- Aplicar o método às amostras reais e comparar com os valores estabelecidos pela ANVISA por meio da Resolução RDC Nº 243/2018 e Instrução Normativa Nº 28/2018;
- Realizar a análise de rotulagem.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Suplementos alimentares e Legislação

“Suplementos alimentares são produtos para ingestão oral, apresentados em formas farmacêuticas, destinados a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados” (Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 243, DE 26 DE JULHO DE 2018 ANVISA, 2018). O uso de suplementos nutricionais tem aumentado nos últimos anos, principalmente nos países desenvolvidos. Estes compostos são considerados uma medicina alternativa versátil pelos usuários devido ao custo relativamente baixo e segurança e eficácia percebidas (MARRERO *et al.*, 2013).

Os contaminantes nesses produtos podem vir de várias fontes, como aquelas usadas durante a síntese de substâncias farmacêuticas ativas (por exemplo, fontes vegetais ou minerais) e excipientes (por exemplo, estabilizadores, cargas, aglutinantes, agentes de liberação), catalisadores metálicos e reagentes metálicos, fragrâncias, cores e revestimentos), impurezas em equipamentos de fabricação (por exemplo, impurezas lixiviadas de tubulações), água e sistemas de tampa de recipiente (BALARAM; RESANO; F. VANHAECKE, 2002). A preocupação com a presença desses elementos químicos em suplementos alimentares decorre do seu potencial tóxico em doses elevadas, o que pode levar a efeitos adversos na saúde dos consumidores.

A ANVISA é a responsável pela regulamentação de suplementos alimentares no Brasil. A Resolução RDC Nº 243/2018 estabelece as normas e requisitos para a fabricação, comercialização e rotulagem de suplementos alimentares no país. Essa Resolução também estabelece que os fabricantes de suplementos alimentares devem utilizar ingredientes que cumpram determinados requisitos de pureza para garantir que os limites máximos permitidos para metais sejam respeitados.

A Instrução Normativa Nº 28/2018 estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Se aplica de maneira complementar à RDC Nº 243/2018 e os Anexos III e IV definem, respectivamente, a lista de limites mínimos e máximos, de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo e por grupo

populacional indicado pelo fabricante (Instrução Normativa - IN Nº 28, de 26 de Julho de 2018 ANVISA, 2018). Essa legislação não estabelece limites máximos de Cd em suplementos alimentares. Neste caso, devem ser considerados os limites estabelecidos para cada constituinte nas especificações das referências reconhecidas pelo artigo 8º da RDC Nº 243/2018. A Farmacopeia Brasileira é umas destas referências, estabelece limites diferenciados para cada elemento de acordo com a sua toxicidade, forma farmacêutica e via de administração, sendo, o limite máximo estabelecido para administração via oral para Cd é de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ANVISA, 2019).

As preocupações globais sobre a segurança e a qualidade dos suplementos são desencadeadas por sua regulamentação limitada, adulterações e potencial contaminações durante a fabricação e armazenamento (UDOUSORO; IKEM; AKINBO, 2017). Por isso é evidente que se desenvolvam métodos cada vez mais robustos para determinação multielementar de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares, que atentam as demandas atuais.

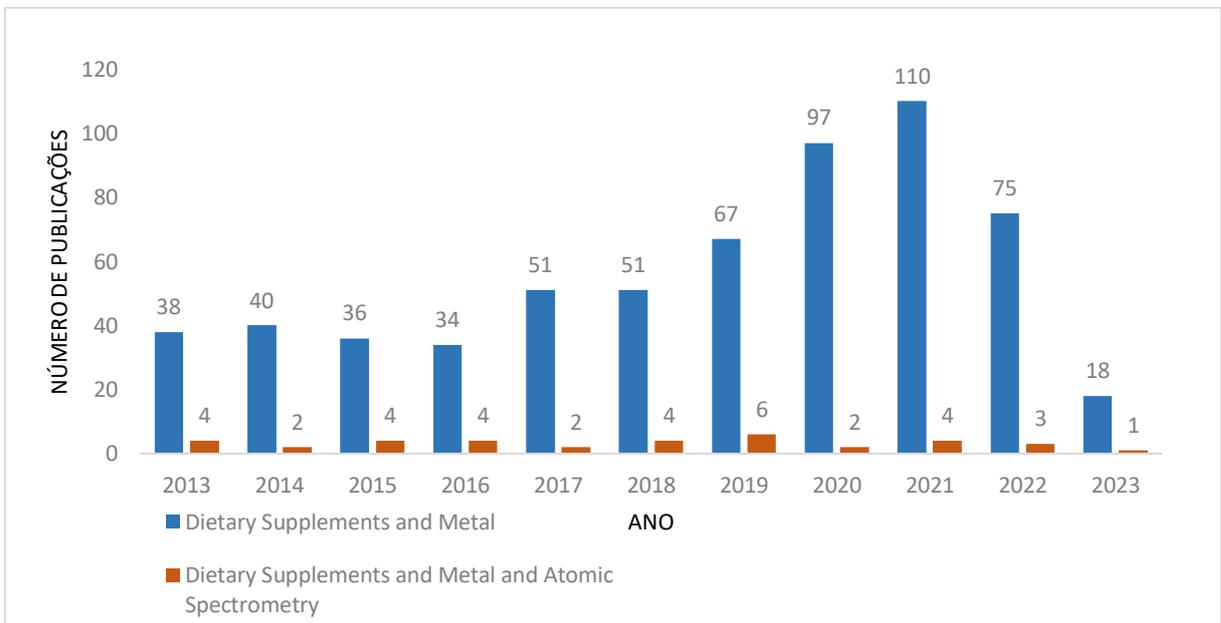
Durante esse trabalho uma pesquisa foi realizada na base de dados *Web of Science*, com a combinação dos termos *dietary supplements*, *metal* e *atomic spectrometry*. Foi avaliado o período de 2013 a 2023, no qual foram encontradas 38.288 publicações com a palavra-chave *dietary supplements*, destas, 617 publicações com a palavra-chave *dietary supplements and metal* e apenas 36 publicações com a palavra-chave *dietary supplements and metal and atomic spectrometry*. A Figura 1 apresenta o gráfico que relaciona o número de publicações por ano, no intervalo de 10 anos. A Figura 2 apresenta o número de publicações neste mesmo período, mas destaca apenas os trabalhos que apresentam as palavras-chave *dietary supplements and metal* e *dietary supplements and metal and atomic spectrometry*, ou seja, segmenta as áreas de interesse deste trabalho. Pela análise da Figura fica nítido que existem poucas pesquisas na área sobre metais em suplementos alimentares e sua análise utilizando absorção atômica, demonstrando a importância desse trabalho. Assim estudos como esse podem vir a contribuir com mais informações sobre a composição de elementos essenciais e não essenciais em suplementos alimentares.

Figura 1 - Número de publicações que contêm as palavras-chave *dietary supplements*; *dietary supplements and metal*; *dietary supplements and metal and atomic spectrometry*. Pesquisa realizada no dia 24 de março de 2023.



Fonte: *Web of Science*.

Figura 2 - Número de publicações que contêm as palavras-chave *dietary supplements and metal*; *dietary supplements and metal and atomic spectrometry*. Pesquisa realizada no dia 24 de março de 2023.



Fonte: *Web of Science*.

3.2 Técnicas para a determinação de metais em suplementos alimentares

Diferentes técnicas analíticas podem ser empregadas para realizar a determinação de metais em suplementos alimentares, cada uma delas apresenta

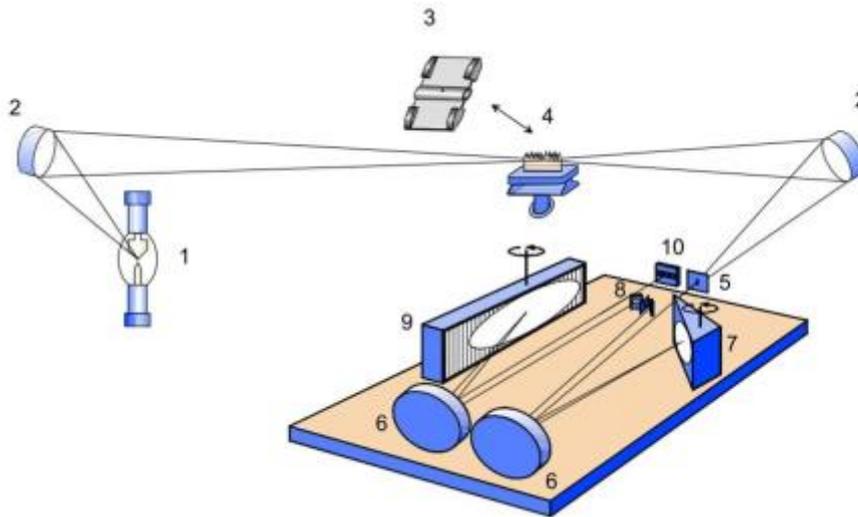
vantagens e desvantagens. A espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES) é uma técnica multielementar, com utilização em diversos segmentos da química analítica. Entretanto, uma das suas desvantagens está associada a interferentes espectrais, devido a sobreposição de linhas analíticas, que podem vir a prejudicar a quantificação de alguns elementos químicos. A espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP MS) é considerada uma das técnicas mais sensíveis para uma ampla gama de elementos e isótopos em várias matrizes. De maneira similar à ICP OES, geralmente é necessário que a amostra seja digerida previamente a leitura no equipamento e não é incomum encontrar métodos analíticos que utilizam padrão interno e/ou combinação de diferentes gases na câmara de reação e colisão afim de reduzir as possíveis interferências causadas por isóbaros (POLETTI *et al.*, 2014).

A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e forno de grafite (GF AAS) são técnicas monoelementares, o que por consequência diminui a frequência analítica (AVULA *et al.*, 2010), se comparada a técnicas multielementares. Entretanto a GF AAS se destaca por permitir a análise direta de amostras sólidas, dispensando a etapa de digestão ácida que, geralmente é um procedimento demorado, que emprega diferentes reagentes e requer maior manipulação da amostra, o que aumenta os riscos de perda de analito ou contaminação da amostra. Nessa técnica, a amostra é pesada diretamente na plataforma de grafite e em seguida inserida no atomizador (forno de grafite) e submetida a um programa de aquecimento. Esse programa, após otimizado, é capaz de eliminar a matriz da amostra durante as etapas de secagem e, principalmente, na etapa de pirólise. Ele promove a remoção dos concomitantes que poderiam interferir durante a atomização, quando ocorre a leitura da absorvância. Outra vantagem da análise direta é que nessa técnica não há diluição da amostra, o que leva a um aumento considerável da sensibilidade do método.

3.2.1 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite por análise direta de amostras sólidas

O primeiro instrumento de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) foi descrito em 1996 (HEITMANN *et al.*, 1996). A Figura 3 apresenta a configuração do instrumento.

Figura 3 - Configuração de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite

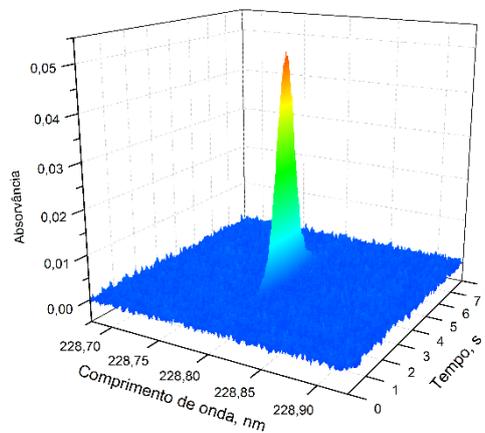


Fonte: (BORGES *et al.*, 2005)

Essa técnica utiliza como fonte de radiação uma lâmpada de arco curto de xenônio, que emite radiação contínua na região do ultravioleta e visível, o que permite o uso dos comprimentos de onda de 185 a 900 nm para a análise. Por isso, linhas de atômicas de baixa intensidade, que não podem ser usadas na espectrometria de absorção atômica tradicional, se tornam acessíveis. O monocromador duplo de alta resolução é composto pela rede de difração *Echelle* e prisma, ambos os componentes selecionam o comprimento de onda de trabalho. O prisma exerce o papel de selecionar parte do feixe de radiação de interesse, já a rede é responsável pela dispersão de alta resolução. A linha analítica de interesse atinge o detector, um dispositivo de carga acoplada (CCD), que adiciona o comprimento de onda como terceira dimensão do sinal analítico. Assim, podemos visualizar o sinal analítico de três formas: *i)* o tradicional sinal da absorvância *versus* tempo, *ii)* o sinal de absorvância integrada *versus* comprimento de onda e *iii)* a imagem tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda (WELZ *et al.*, 2014). Todavia, a possibilidade dessa visualização também permite a realização de determinações multielementares, quando uma linha de absorção secundária de outro analito se enquadra, exatamente, na janela espectral sob avaliação (BORGES *et al.*, 2005).

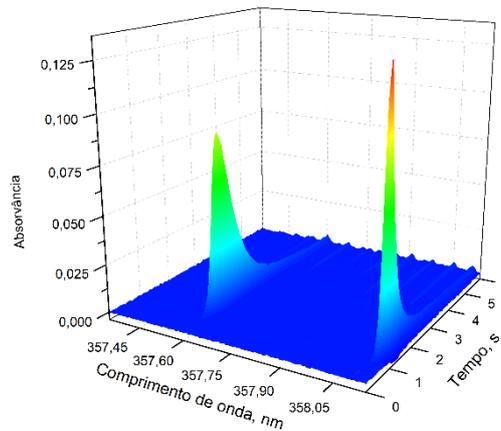
As características descritas acima possibilitam a determinação sequencial e/ou simultânea de elementos, dependendo da proximidade das linhas analíticas e/ou do comportamento térmico deles no forno de grafite. A análise multielementar simultânea é geralmente possível apenas para alguns elementos, que devem mostrar linhas adjacentes próximas (RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014). A Figura 4 ilustra um espectro de uma medida de um padrão, para Cd, na linha com 100% de sensibilidade é 228,802 nm. Esse é um exemplo de uma análise monoelementar. A Figura 5 apresenta a medida de uma determinação simultânea de Cr e Fe utilizando as linhas de 357,869 nm para Cr (100% de sensibilidade) e 358,120 nm para o Fe (1% de sensibilidade). Devido a maior volatilidade do cádmio em relação ao cromo e ferro, é possível, a partir de uma mesma alíquota de amostra inserida no forno, realizar primeiramente a atomização e determinação de cádmio e, na sequência, alterando a temperatura de atomização e região espectral, determinar, simultaneamente, cromo e ferro. Dessa forma tem-se uma análise sequencial e simultânea de três elementos.

Figura 4 - Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança da linha analítica de cádmio. Tp: 700 °C; Ta: 1700 °C



Fonte: Autora

Figura 5 - Espectro de absorvância resolvido temporalmente na vizinhança das linhas analíticas de cromo e ferro em um padrão. Tp: 1700 °C; Ta: 2600 °C



Fonte: Autora.

3.3 Parâmetros de mérito

A análise química é de grande importância em diversas áreas, desde o controle de qualidade de produtos até a pesquisa em laboratórios acadêmicos. Um aspecto fundamental da análise química é a utilização de métodos analíticos precisos e confiáveis. Os parâmetros de mérito são fundamentais para avaliar a qualidade desses métodos e garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

3.3.1 Exatidão

A exatidão é uma das principais métricas de desempenho de um método e é uma medida da proximidade entre o valor medido e o valor verdadeiro. A exatidão é uma medida importante porque determina a confiabilidade dos resultados obtidos pelo método analítico e, portanto, sua adequação para a finalidade desejada. Se um método é tendencioso em relação ao valor verdadeiro, isso pode levar a resultados inexatos, o que pode ser prejudicial em termos de tomada de decisões.

Uma das principais técnicas utilizadas para avaliar a exatidão de um método analítico é a análise de materiais de referência certificados, que são amostras com concentrações conhecidas e certificadas de um analito. A comparação dos resultados obtidos pelo método analítico com os valores certificados pode fornecer uma avaliação da exatidão do método (ABNT, 2018).

A avaliação da exatidão também pode ser feita através da comparação com um método de referência. As análises são realizadas em replicatas, usando ambos os métodos, nas mesmas amostras, em toda a faixa de concentração para a qual o

método foi projetado para ser validado. Existem várias formas de comparar os resultados obtidos por dois métodos diferentes, uma delas é o teste de hipótese. No teste de hipóteses, o teste F é aplicado primeiro a fim de avaliar se as variâncias são estatisticamente iguais ou diferentes. Em seguida, é realizado o teste *t-Student* para verificar se as médias dos resultados obtidos pelos dois métodos podem ser consideradas estatisticamente iguais (ABNT, 2020).

Existem vários fatores que podem afetar a exatidão de um método analítico, incluindo a seleção inadequada de padrões de calibração, a interferência de componentes da matriz da amostra, erros de instrumentação e falhas na preparação da amostra.

3.3.2 Precisão

A precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos exatamente da mesma forma. Quanto menor a variabilidade das medidas, maior será a precisão. Essa medida reflete a tendência de maior ou menor afastamento entre os resultados dos ensaios (RAYA-RODRIGUEZ; DE MEDEIROS ALBANO, 2015). Esse parâmetro pode ser calculado através do desvio padrão relativo (RSD), demonstrado pela Equação 1.

$$RSD = \frac{\sigma}{m\acute{e}dia} \times 100 \quad (1)$$

Sendo, RSD o desvio padrão relativo, σ o desvio padrão das medidas das amostras e $m\acute{e}dia$, a $m\acute{e}dia$ das replicatas.

Na grande maioria das vezes, a precisão de um método diminui à medida que a concentração do analito diminui (AOAC, 2016). O Quadro 1, adaptado da guia do Inmetro DOQ-CGCRE-008 (ABNT, 2020), indica a precisão esperada (repetibilidade) em função da concentração de analito. Esse quadro fornece os valores de RSD para várias de concentrações de analito.

Quadro 1 - Critérios de aceitação para repetibilidade

Analito (%)	Fração Mássica (C)	Unidade	RSD (%)
100	1	100%	1,3
10	10 ⁻¹	10%	1,9
1	10 ⁻²	1%	2,7
0,1	10 ⁻³	0,1%	3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg.kg ⁻¹)	5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg.kg ⁻¹)	7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg.kg ⁻¹)	11
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg.kg ⁻¹)	15
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg.kg ⁻¹)	21
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg.kg ⁻¹)	30

Fonte: (ABNT, 2020)

A precisão é um parâmetro importante na avaliação da qualidade dos resultados analíticos, uma vez que a variação dos resultados pode levar a erros de interpretação e a resultados incorretos. Por isso, é importante que os métodos analíticos sejam validados quanto à precisão.

3.3.3 LOD

O limite de detecção (LOD) é um parâmetro de mérito que indica a menor quantidade ou concentração de analito na amostra que pode ser detectada com precisão e exatidão aceitáveis (ABNT, 2020).

O limite de detecção é determinado experimentalmente e depende do método analítico utilizado e das características da amostra analisada. Geralmente, é calculado a partir do desvio padrão do sinal gerado pelas medidas do branco do método, ou seja, sem a presença da substância de interesse e da sensibilidade do método, isto é a inclinação da curva analítica. Conforme mostrado na Equação 2.

$$LOD = \frac{3\sigma}{S} \quad (2)$$

Sendo, LOD o limite de detecção, σ o desvio padrão de dez medidas do branco e S o coeficiente angular da curva de calibração.

O limite de detecção é importante porque fornece uma medida da sensibilidade do método analítico. Quanto menor o limite de detecção, mais sensível é o método analítico. Ele é utilizado para avaliar se um método analítico é adequado para a análise

de amostras com concentrações muito baixas da substância de interesse. O método deve ser capaz de detectar a substância de interesse em concentrações que sejam relevantes do ponto de vista analítico e que possam estar presentes nas amostras analisadas (ABNT, 2018).

3.3.4 LOQ

O limite de quantificação (LOQ) é um parâmetro importante em química analítica, que indica a menor quantidade de um analito que pode ser quantificado por um método analítico específico, com precisão e exatidão aceitáveis (RAYA-RODRIGUEZ; DE MEDEIROS ALBANO, 2015).

O LOQ é importante porque é uma medida da sensibilidade do método analítico e, portanto, da sua capacidade de quantificar amostras com baixas concentrações do analito. Existem vários fatores que podem afetar o LOQ de um método analítico, incluindo a sensibilidade do detector, a interferência de outros componentes da amostra, a matriz da amostra e o método analítico utilizado. É calculado a partir do desvio padrão do sinal produzido pelas medidas do branco do método, ou seja, a ausência da substância de interesse e a sensibilidade do método, conforme apresentado na Equação 3.

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (3)$$

Sendo, LOQ o limite de quantificação, σ o desvio padrão de dez medidas do branco e S o coeficiente angular da curva de calibração.

Além disso, é importante destacar que o LOQ não deve ser confundido com o LOD, que é a concentração mínima que pode ser detectada com uma probabilidade específica (geralmente 99%). O LOD é um parâmetro importante para avaliar a sensibilidade de um método analítico, mas é geralmente mais baixo do que o LOQ, porque a detecção do analito não implica necessariamente a sua quantificação precisa.

3.3.5 Massa característica

A massa característica, m_0 , é determinada como a massa de analito necessária para produzir um sinal de absorvância integrada de 0,0044 s, equivalente a 1% do sinal de absorção. A m_0 é calculada conforme apresentado na Equação 4.

$$m_0 = \frac{m \times 0,0044}{A_{int}} \quad (4)$$

Sendo, m_0 a massa característica, m a massa de analito localizada em um ponto intermediário da curva de calibração e A_{int} a absorvância integrada produzida por essa massa (s).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentos

Para a purificação da água, com resistividade de 18,2 M Ω cm a 25 °C, foi utilizado um sistema de ultra purificação (Milli-Q, Millipore, Massachusetts, EUA). O ácido nítrico concentrado foi bidestilado utilizando um destilador de quartzo, que destila abaixo do ponto de ebulição (Marconi, Piracicaba, Brasil).

A pesagem das amostras, utilizadas nas digestões ácidas, foi feita em uma balança analítica (Mettler Toledo, Barueri, Brasil).

As amostras na forma de comprimido foram moídas em um moinho analítico (IKA, Campinas, Brasil), que possui velocidade máxima de 28000 rpm. Para a moagem foi utilizada uma lâmina de corte para pulverizar materiais macios e fibrosos. A câmara de moagem e a lâmina são compostas por aço inoxidável. Para a digestão das amostras, foi utilizado um forno micro-ondas modelo Multiwave PRO (Anton Paar, Áustria) com rotor de 24 posições, modelo 24HVT50.

Para a quantificação dos analitos nas amostras pela análise direta, foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo contrAA 700 (AnalytikJena AG, Jena, Alemanha), acoplado com um amostrador manual SSA 6 (AnalytikJena AG, Jena, Alemanha) e uma pinça que auxilia na inserção da plataforma de grafite para análise de sólidos (AnalytikJena, Part no. 407-152.023) no atomizador, o forno de grafite recoberto piroliticamente sem orifício dosador, específico para amostragem de sólidos (AnalytikJena, Part no. 407-A81.303). As amostras foram pesadas diretamente sobre a plataforma, utilizando uma micro balança M2P (Sartorius, Göttingen, Alemanha). O gás argônio com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás proteção e purga.

Para a quantificação dos analitos nas amostras digeridas assistidas por radiação micro-ondas (MW-AD), foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com fonte de linha modelo ZEE nit 650 P (AnalytikJena AG, Jena, Alemanha) acoplado com um amostrador automático para amostras líquidas, modelo MPE 60. Foram empregados fornos de grafite recobertos com grafite pirolítico, com orifício dosador para amostragem de líquidos. Foram empregados fornos com plataforma integrada

ao tubo (AnalytikJena, 407-152.314) e sem plataforma (AnalytikJena, 407-152.315). O gás argônio foi utilizado como gás proteção e purga.

4.2 Reagentes e materiais certificados

Para a descontaminação dos fracos utilizados para o armazenamento das amostras, bem como toda a vidraria necessária para a realização do estudo, inicialmente o material foi lavado com água tratada da rede, depois foi enxaguado três vezes com água deionizada e deixado de molho, por um período de no mínimo 24 h, em um banho de HNO₃ 10% (v.v⁻¹). Posteriormente o material foi retirado do banho e enxaguado três vezes com água ultra pura e deixado secar em capela de fluxo lamilar (Hexiclean, Curitiba, Brasil).

Água ultrapura foi utilizada para o preparo de todas as soluções: padrão, amostras e modificadores. As soluções padrão intermediárias e de trabalho foram preparadas em meio aquoso, com HNO₃ 0,014 mol.L⁻¹, para estabilizar o analito em solução. As soluções padrão foram preparadas a partir de soluções estoque de cádmio (Cd), cromo (Cr) e ferro (Fe) na concentração de 1000 mg.L⁻¹ (SpecSol, QuimLab, São Paulo, Brasil).

As soluções dos modificadores químicos foram preparadas a partir de soluções comerciais de Pd(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂ em HNO₃ na concentração de 10 g.L⁻¹ (SpecSol, QuimLab, São Paulo, Brasil) de paládio e magnésio, respectivamente, e nas soluções modificadoras foi adicionado Triton X-100 0,05% (v.v⁻¹) (Union Carbide, Houston, EUA).

A exatidão do método foi avaliada pela análise de um material de referência padrão de folha de tomate (*Standard Reference Material (SRM) 1573a Tomato Leaves* (National Institute of Standards and Technology (NIST) - Gaithersburg, EUA)).

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Amostras de suplementos

As amostras de suplementos alimentares utilizadas nesse trabalho foram compradas em lojas especializadas e farmácias de Porto Alegre - RS, Brasil. Foram analisadas amostras de coenzima (CE), colágeno (CO), indutor de sono (IS), poli vitamínico (PV), vitamina D (VD) e *whey protein* (WP) comercializadas nas formas de cápsula, pó e comprimido. O Quadro 2 apresenta a identificação dessas amostras,

juntamente com a forma como elas são comercializadas, faixa etária e recomendação diária de consumo. Para as amostras em cápsula, o único preparo foi abrir a cápsula para a análise do pó, sendo a cápsula descartada. As amostras em pó não foram submetidas a nenhum preparo e as amostras em comprimido foram moídas no moinho analítico. Todas as amostras foram acondicionadas em tubos *ependorf* até o momento da análise.

Quadro 2 - Identificação das amostras de suplementos alimentares

Código	Faixa Etária Recomendada	Forma de Comercialização	Recomendação do Fabricante
CE01	≥ 19 anos	Cápsula	1 cápsula/dia (0,65 g/dia)
CO01	≥ 19 anos	Pó	1 sachê/dia (12 g)
CO02	≥ 19 anos	Pó	10 g/dia
IS	≥ 19 anos	Pó	5 g/dia
PV01	≥ 50 anos	Cápsula	2 cápsulas/dia (1,1g/dia)
PV02	≥ 19 anos	Cápsula	1 cápsula/dia (0,55g/dia)
PV03	≥ 3 anos	Comprimido	1 comprimido/dia (0,630 g/dia)
VD	≥ 19 anos	Comprimido	1 comprimido/dia (1,260g/dia)
WP01	≥ 19 anos	Pó	1 a 2 porções (35 g à 70 g/dia)
WP02	≥ 19 anos	Pó	35 g/dia

Fonte: Autora.

4.3.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas

Para o preparo dos brancos e padrões digeridos, foi adicionado 5,00 mL de HNO₃ bidestilado nos frascos de PTFE. Para os padrões foi adicionada, também, com uma micropipeta, a alíquota necessária para que ao final a concentração dos analitos fosse: 2 µg.L⁻¹ de Cd, 20 µg.L⁻¹ de Cr e 2 mg.L⁻¹ de Fe. Para isso, realizou-se primeiramente o preparo de soluções intermediárias de 100 µg.L⁻¹ de Cd, de 1mg.L⁻¹ de Cr e de 100 mg.L⁻¹ de Fe a partir das soluções padrão de concentração de 1000 mg.L⁻¹. A partir dessas soluções foram pipetados 100,0 µL para os tubos digestores.

Para a digestão das amostras de suplementos, primeiramente, em uma balança analítica foi medida a massa de, aproximadamente, 0,1 g, em um papel manteiga, com o auxílio de uma espátula de aço cirúrgico. Essa massa foi transferida, para os frascos de PTFE e, sobre as amostras, foi adicionado 5,00 mL de HNO₃ bidestilado, os frascos foram fechados acomodados no rotor e levados ao micro-ondas. As amostras, brancos e soluções padrão foram preparados em duplicata. O programa de

aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para a decomposição das amostras, preparo dos brancos e padrões está apresentado na Tabela 1. Foi estabelecido 200 °C como temperatura interna máxima dos tubos, acima dessa temperatura o equipamento desliga a potência, como medida de segurança e só volta a ligar quando a temperatura de trabalho é reestabelecida.

Tabela 1 - Programa de aquecimento para a digestão das amostras de suplementos alimentares

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Rampa de Temperatura	120	20
Tempo de Permanência	120	5
Rampa de Temperatura	180	20
Tempo de Permanência	180	5
Resfriamento	70	19

Fonte: Autora.

Após a etapa de resfriamento, da Tabela 1, os tubos digestores foram abertos e as soluções das amostras foram transferidas quantitativamente para tubos do tipo Falcon, com água ultrapura e as soluções finais foram avolumadas até 10,0 mL. As amostras foram conservadas em geladeira até a análise.

A descontaminação dos frascos de politetrafluoretileno (PTFE) foi feita a partir de uma limpeza no próprio micro-ondas. A cada frasco foi adicionado 4 mL de HNO₃ concentrado bidestilado, 1 mL de água ultrapura e 1 mL de H₂O₂ 35%, eles foram fechados, levados para o micro-ondas e submetidos ao programa de limpeza mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Programa de aquecimento para a descontaminação dos frascos de PTFE

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Rampa de Temperatura	180	5
Tempo de Permanência	180	10
Resfriamento	70	19

Fonte: Autora.

4.3.3 Medidas no espectrômetro de absorção atômica com fonte de linha e forno de grafite - Método de Referência

A construção das curvas de calibração, as medidas dos brancos e determinação dos analitos nas amostras foram feitas automaticamente pelo amostrador. Essa praticidade minimiza possíveis erros de pipetagem, garantindo transferências confiáveis de alíquotas. As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições sucessivas de soluções estoque de 2,5 µg.L⁻¹ Cd, 50 µg.L⁻¹ Cr e de

2 mg.L⁻¹ Fe, com a solução branco de 0,014 mol L⁻¹ HNO₃. O modificador químico também foi pipetado automaticamente. Para Cd, foi utilizada a alíquota de 10,0 µL da solução mista de Pd(NO₃)₂ 0,05% (m.v⁻¹) + Mg(NO₃)₂ 0,03% (m.v⁻¹) + Triton X-100 0,05% (v.v⁻¹). Para Cr e Fe foi utilizada uma alíquota de 5 µL de Mg(NO₃)₂ 0,05% (m.v⁻¹) + Triton X-100 0,05% (v.v⁻¹). Perfazendo um volume total de 30,0 µL para Cd e 15,0 µL para Cr e Fe, no atomizador, em cada medida.

As condições do instrumento foram ajustadas utilizando o espectrofotômetro com corretor de fundo baseado no efeito Zeeman, como fonte de radiação foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Cd (Hitachi, Tóquio, Japão), de Cr (NARVA G. L. E, Berlim, Alemanha), de Fe (IST, Nova York, EUA) e tempo de integração foi de 6 s. As condições operacionais estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições operacionais aplicadas nos métodos analíticos para a determinação de Cd, Cr e Fe

Parâmetro	Cd	Cr	Fe
Comprimento de onda (nm)	228,8 (100% sensibilidade)	357,9 (100% sensibilidade)	296,7 (12% sensibilidade)
Fenda espectral (nm)	0,8	0,8	0,2
Corrente (mA)	2	4	4
Campo (T)	0,8	0,7	0,8
Alíquota de amostra (µL)	20	10	10
Modificador	Pd/Mg	Mg	Mg
Alíquota do modificador (µL)	10	5	5

Fonte: Autora.

Para determinação dos elementos de interesse foi pipetado automaticamente 20,0 µL de amostra e 10,0 µL de modificador para Cd e 10,0 µL de amostra e 5,0 µL de modificador para Cr e Fe. Algumas amostras apresentaram elevadas concentrações de Fe e Cr, sendo necessário realizar diluições para que a concentração ficasse dentro da faixa de trabalho. As diluições foram realizadas em balões volumétricos, mantendo a concentração de 0,014 mol L⁻¹ HNO₃. A Tabela 4 apresenta o programa de temperatura empregado nas análises por LS-GF AAS.

Tabela 4 - Programa de temperatura empregado na quantificação de Cd, Cr e Fe por LS-GF AAS

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C. s ⁻¹)	Patamar (s)	Purga (L.min ⁻¹)
Secagem I	80	6	20	2,0
Secagem II	90	3	20	2,0
Secagem III	110	5	10	2,0
Pirólise I	350	50	20	2,0
Pirólise II	600 ^a / 1300 ^b	300	10	2,0
AZ*	600 ^a / 1300 ^b	0	6	0
Atomização	1600 ^a / 2600 ^b	1500	6	0
Limpeza	2450 ^a / 2600 ^b	500	4	2,0

^a Cd; ^b Cr e Fe

Fonte: Autora.

4.3.4 Medidas no espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e forno de grafite

Foi utilizado um método que avalia de forma sequencial Cd e simultaneamente Cr e Fe que, foi otimizado em um trabalho de dissertação em desenvolvimento no Grupo de Análise de Traços (GAT - UFRGS). Foram monitoradas as linhas analíticas de 228,802 nm para Cd (100% de sensibilidade), 357,869 nm para Cr (100% de sensibilidade) e 358,120 nm para o Fe (1% de sensibilidade), sendo as linhas do Cr e Fe monitoradas simultaneamente. Foi medida a absorvância integrada do pixel central (CP) e dos dois pixels laterais para todos os analitos, que corresponde aos pixels (101 ± 1 para Cd), 66 ± 1 para Cr e 193 ± 1 para Fe. O programa de aquecimento desse método está apresentado na Tabela 5.

O gás argônio foi usado como gás de purga e de proteção, com fluxo máximo (2,0 L.min⁻¹) durante todas as etapas, exceto na atomização, etapa na qual o fluxo de argônio foi interrompido. Nas amostras com maiores concentrações dos analitos foi necessário o uso de fluxo de gás mínimo (0,1 L.min⁻¹) durante a atomização. Também se ajustou o número de pixels avaliados. Nas amostras com baixas concentrações, foram usados os pixels centrais (CP ± 1), de maior sensibilidade. Já para as amostras com maiores concentrações foram usadas as asas do pico, os pixels -3 e +3. Para a curva foram preparadas soluções intermediárias de 1 mg.L⁻¹ de Cd e 2 mg.L⁻¹ de Cr a partir da solução padrão de 1000 mg.L⁻¹. A partir destas soluções intermediárias e da solução padrão estoque de 1000 mg.L⁻¹ de Fe, foi preparada uma solução padrão multielementar com as concentrações de 2 µg.L⁻¹ de Cd, 20 µg.L⁻¹ de Cr e 2 mg.L⁻¹ de Fe. Nesse método foi utilizada uma solução mista de Pd(NO₃)₂ 0,05% (m.v⁻¹) e

Mg(NO₃)₂ 0,03% (m.v⁻¹) + Triton X-100 0,05% (v.v⁻¹) como modificador químico em solução.

As curvas de calibração construídas, as medidas dos brancos e amostras foram feitas manualmente, empregando o amostrador manual para sólidos e micropipetas. Para as curvas foi adicionado diretamente na plataforma, com uma micropipeta 10,0 µL de soluções multielementares com diferentes concentrações e 10,0 µL do modificador químico. Já para os brancos da curva são adicionados apenas 10,0 µL da solução branco (HNO₃ 0,014 mol L⁻¹) e 10,0 µL do modificador químico.

Para as amostras, primeiramente foram aferidas massas com intervalo de 0,06 a 1,050 mg, diretamente na plataforma de grafite, utilizando uma microbalança e sobre as amostras foi adicionado com uma micropipeta 10,0 µL do modificador químico. A plataforma foi então inserida no forno de grafite, com o auxílio da pinça e foi submetida ao programa de aquecimento apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Programa de aquecimento para a determinação simultânea e sequencial de Cd, Cr e Fe, por HR-CS GF AAS

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C.s ⁻¹)	Patamar (s)	Purga (L.min ⁻¹)
Secagem	120	10	30	Máx
Pirólise 1	700	300	40	Máx
Atomização do Cd	1700	2500	6	Stop
Troca de comprimento de onda				
Pirólise 2	1700	300	1	Máx
Atomização do Cr e Fe	2600	FP	6	Stop
Limpeza	2600	0	4	Máx

Fonte: Autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros de mérito

5.1.1 Limites de detecção, limites de quantificação e massa característica

Todas as curvas de calibração foram construídas a partir de soluções padrão aquosas. No caso da técnica de HR-CS GF AAS foram empregadas soluções multielementares. Já na técnica de LS-GF AAS foram usadas soluções padrão monoelementares. A Tabela 6 apresenta as faixas de trabalho, em concentração, para cada condição de medida empregada.

Tabela 6 - Faixa de trabalho empregada para as diferentes condições de medida utilizando a LS-GF AAS e de HR-CS GF AAS

Técnica	Analito	Condição	Faixa de Trabalho
LS-GF AAS	Cd		0,25 a 2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	Cr		5 a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	Fe		0,1 a 2 mg.L^{-1}
HR-CS GF AAS	Cd		0,25 a 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	Cr	A: Sem fluxo de gás e CP ± 1	0,25 a 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	Fe		0,25 a 6 mg.L^{-1}
	Cd		1 a 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	Cr	B: Com fluxo de gás mínimo e CP ± 1	10 a 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	Fe		2 a 8 mg.L^{-1}
	Cr	C: Com fluxo de gás mínimo e pixels -3/+3	180 a 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	Fe		40 a 300 mg.L^{-1}

Fonte: Autora.

Os parâmetros limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram obtidos respectivamente, através das Equações 1 e 2 e a massa característica (m_0), através da equação 3.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros de mérito obtidos pelas técnicas de LS-GF AAS e de HR-CS GF AAS, utilizando as diferentes condições de avaliação do sinal citadas na Tabela 6. Os valores de LOD e LOQ, em concentração, foram calculados considerando a massa máxima de amostra que pode ser inserida no forno de grafite, sendo essa de 1,2 mg.

Comparando os valores de LOD e LOQ obtidos pelas técnicas de LS-GF AAS e de HR-CS GF AAS empregando a condição A, ou seja, quando não tem fluxo de gás mínimo durante a etapa de atomização, é possível observar que a técnica HR-CS GF AAS apresenta uma maior sensibilidade, que pode ser percebida através dos valores de LOD, LOQ e m_0 . Isso ocorre pois nessa técnica a amostra é analisada diretamente enquanto na LS-GF AAS a amostra é diluída na etapa de decomposição ácida. Os valores de m_0 dessas duas técnicas - novamente considerando a condição A da HR-CS GF AAS - são equiparáveis e estão de acordo com os valores reportados pelos fabricantes dos instrumentos.

Os suplementos alimentares foram analisados na condição A para Cd. O LOQ dessa condição é $6,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, aproximadamente 77 vezes menor que o limite máximo é de $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$, estabelecido pela Farmacopeia Brasileira. Logo, o método atende aos limites da legislação e é adequado para a determinação de cádmio em suplementos alimentares.

Para determinação de Cr, os suplementos alimentares CO01, CO2, IS, WP01 e WP02 foram analisados na condição A; CE01 na condição B e PV01, PV02, PV03 e VD na condição C. O LOQ na condição A é $15,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$, na condição B é $150,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e na condição C é $597,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Para comparar esses valores com o limite mínimo recomendado pela Instrução Normativa Nº 28, de 26 de julho de 2018 da ANVISA foi considerada a dose diária recomendada pelo fabricante, no cálculo. Por exemplo, a dose diária recomendada do suplemento CE02 é 10 g e, de acordo com a legislação, o limite mínimo de Cr é de 5,25 μg . Logo para essa amostra a concentração mínima de cromo encontrada na amostra seria de $525 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Esse valor é bem maior que os valores de LOD e LOQ do método e pode-se concluir que os valores de LOD e LOQ do método proposto conseguem atender tranquilamente os limites da legislação vigente.

Para determinação de Fe, os suplementos alimentares CO01, CO2, IS, WP01 e WP02 foram analisados na condição A, CE01 na condição B e PV01, PV02, PV03 e VD na condição C. A Instrução Normativa Nº 28, de 26 de julho de 2018 da ANVISA estabelece o valor de 2,7 mg de Fe como limite mínimo, que é um valor bastante elevado e pode ser facilmente determinado pela técnica de HR-CS GF AAS. Nesse caso o maior desafio é alcançar uma condição de baixa sensibilidade, para que o limite superior da faixa de trabalho não seja excedido.

Tabela 7 - Parâmetros de mérito de Cd, Cr e Fe obtidos pelas técnicas de LS-GF AAS e de HR-CS GF AA, utilizando as condições descritas na Tabela 6

Técnica	Condição	Analito	Equação da reta	R ²	LOD (µg.kg ⁻¹)	LOQ (µg.kg ⁻¹)	m ₀ (pg)
LS-GF AAS		Cd	$A_{int} = 0,1053c(\mu\text{g.L}^{-1}) + 0,017$	0,9932	7	22	0,8
		Cr	$A_{int} = 0,0085c(\mu\text{g.L}^{-1}) + 0,0098$	0,9989	18	60	3,6
		Fe	$A_{int} = 0,3871c(\text{mg.L}^{-1}) + 0,0403$	0,997	2 ^a	6 ^a	120
HR-CS GF AAS	A	Cd	$A_{int} = 0,0053m(\text{pg}) + 0,0173$	0,9972	1,9	6,5	0,8
		Cr	$A_{int} = 0,0010m(\text{pg}) + 0,0163$	0,9978	4,8	16	4,6
		Fe	$A_{int} = 0,0085m(\text{ng}) + 0,0125$	0,9962	0,7 ^a	2,5 ^a	52
	B	Cd	$A_{int} = 0,0027m(\text{pg}) + 0,0071$	0,9915	11	36	1,6
		Cr	$A_{int} = 0,0007m(\text{pg}) - 0,0005$	0,9962	45	150	6,3
		Fe	$A_{int} = 0,0042m(\text{ng}) + 0,0078$	0,9943	12 ^a	41 ^a	1,0 ^b
	C	Cr	$A_{int} = 0,00004m(\text{pg}) - 0,0024$	0,9955	182	607	117
		Fe	$A_{int} = 0,0002m(\text{ng}) + 0,0195$	0,9965	48 ^a	160 ^a	26 ^b

^a mg.kg⁻¹, ^b ng

Fonte: Autora.

5.1.2 Exatidão

Para confirmar a exatidão do método proposto pelo Grupo de Análise de Traços (GAT - UFRGS) para a determinação multielementar de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares empregando a HR-CS GF AAS via análise direta de amostras sólidas, primeiramente, foi analisado o SRM NIST 1573a. Os valores certificados e os valores encontrados no estudo estão representados na Tabela 8.

Os resultados obtidos e certificados foram comparados pelo teste *t-Student*, considerando o nível de confiança de 95%. A Tabela 8 também apresenta os valores de *t* calculado. Pode-se observar que os valores de *t* calculado são menores que o do *t* crítico (3,28). Constata-se então que as concentrações encontradas para os analitos são estatisticamente iguais às concentrações certificadas, demonstrando que o método proposto é exato.

Tabela 8 - Avaliação da exatidão utilizando o SRM NIST 1573a por HR-CS GF AAS (n = 4). *t* crítico = 3,28 para 95% de confiança e 3 graus de liberdade.

NIST 1573a Tomato Leaves	Cd	Cr	Fe
Valores Certificados	1520 ± 40 µg.kg ⁻¹	1990 ± 60 µg.kg ⁻¹	368 ± 7 mg.kg ⁻¹
Valores Encontrados	1439 ± 87 µg.kg ⁻¹	2287 ± 336 µg.kg ⁻¹	421 ± 73 mg.kg ⁻¹
<i>t</i> calculado	1,08	1,45	1,46

Fonte: Autora.

Tendo em vista que o SRM era constituído de uma matriz distinta das amostras, a exatidão do método também foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos pela análise direta pela técnica de HR-CS GF AAS com aqueles obtidos por um método considerado de referência, a digestão assistida por micro-ondas das amostras e quantificação por LS-GF AAS, utilizando as condições estabelecidas pelo fabricante do espectrômetro.

Foram analisadas 4 amostras de suplementos alimentares. Uma vez que a técnica de LS-GF AAS apresentou maiores valores de LOD e LOQ, foram escolhidas as amostras que apresentaram sinal mais alto de Cd em um estudo preliminar para a realização desses ensaios. As concentrações dos analitos encontradas utilizando a análise direta por HR-CS GF AAS ou pelo método de digestão em micro-ondas e quantificação por LS-GF AAS estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados analíticos obtidos para determinação de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares por análise direta empregando a HR-CS GF AAS e por LS-GF AAS, após digestão em micro-ondas

Analito	Código	HR-CS GF AAS	RSD	LS-GF AAS	RSD	t calculado
Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	PV01	91,0 \pm 32,7	36%	142 \pm 3	2,1%	1,36
	PV03	90,0 \pm 34,3	38%	99,2 \pm 5,2	5,2%	
	WP01	33,3 \pm 3,0	9,1%	36,2 \pm 1,5	4,1%	
	WP02	41,7 \pm 3,3	7,9%	42,6 \pm 1,3	3,1%	
Cr ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	PV01	12,9 \pm 2,6	20%	17,1 \pm 1,3	7,6%	0,14
	PV03	4,68 \pm 0,73	16%	2,93 \pm 0,08	2,7%	
	WP01	1,82 \pm 0,18	10%	1,17 \pm 0,02	1,7%	
	WP02	1,07 \pm 0,13	12%	1,01 \pm 0,05	5,0%	
Fe ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	PV01*	5,72 \pm 0,66	12%	6,44 \pm 0,16	2,5%	1,14
	PV03*	16,5 \pm 2,4	14%	23,4 \pm 3,2	14%	
	WP01	138 \pm 11	8,4%	141 \pm 7	5,0%	
	WP02	77,0 \pm 8,3	11%	97,1 \pm 3,8	3,9%	

* $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

Fonte: Autora.

Primeiramente foi aplicado o teste F, os valores do F calculado são menores que o F crítico, cujo valor é 9,28, para 3 graus de liberdade, considerando o nível de confiança de 95%, então as variâncias das concentrações encontradas pelas duas técnicas são estatisticamente iguais. Após foi aplicado o teste *t-Student*: duas amostras em par para médias. Considerando o nível de confiança de 95%, os valores do t calculado são menores que o t crítico bicaudal, cujo valor é 3,18, para 3 graus de liberdade, evidenciando que as concentrações encontradas nas amostras de suplementos alimentares, pelas duas técnicas, não apresentam diferenças significativas entre suas concentrações. Portanto, estatisticamente, o método proposto é exato e pode ser utilizado para a determinação de Cd, Cr e Fe em suplementos alimentares.

5.1.3 Precisão

Os valores calculados de RSD das amostras utilizando a análise direta por HR-CS GF AAS ou pelo método de digestão em micro-ondas e quantificação por LS-GF AAS estão apresentados na Tabela 9. Comparando as amostras de polivitamínico PV 01 e PV 03, que são vendidas na forma de cápsula e comprimido, respectivamente, com as amostras de *whey protein* (WP), que são comercializadas em pó, notou-se que a forma como é distribuída a amostra impacta no RSD. Como dito anteriormente, o único preparo das amostras em cápsula foi abri-las para analisar o pó contido no

seu interior e as amostras no formato de comprimido foram trituradas, logo houve uma maior heterogeneidade desse tipo de amostra se comparadas com as amostras já vendidas na forma de pó. Isso explica os maiores valores de RSD nas amostras de PV comparadas com as amostras de WP.

Em geral, massas muito pequenas (< 100 mg) tendem a comprometer a representatividade, uma vez que os elementos-traço podem não estar homogeneamente distribuídos nos materiais (KRUG; PIOVEZANI ROCHA, 2019). Portanto, a incerteza da amostragem laboratorial torna-se mais importante, pois dará uma contribuição maior para a incerteza do resultado, devido a uma menor representatividade amostral. Neste estudo, ficou evidente que as amostras analisadas diretamente pela técnica HR-CS GF AAS tiveram menor precisão devido ao uso de massas menores (cerca de 0,5 mg), se comparadas com as amostras que passaram pelo processo de digestão em que a massa amostral utilizada foi de 0,1 g, aproximadamente 200 vezes mais massa que na análise direta, o que melhora a representatividade da amostra.

A amostra PV03 apresenta maiores RSD pelas duas técnicas, exceto para o Cr por LS-GF AAS. A Figura 6 apresenta a imagem dessa amostra após ser moída. É possível notar que a amostra é bastante heterogênea. Isso se deve ao fato que esse polivitamínico está disponível na forma de comprimido; observa-se que há fragmentos de coloração rosa, oriundos da parte externa que envolve o comprimido. Essa heterogeneidade da amostra explica os elevados valores de RSD. Comparando as duas técnicas, a análise direta apresentou maior RSD, em virtude do uso de uma menor massa se comparada à análise na qual se usa uma massa maior de amostra para digestão.

Figura 6 - Amostra do polivitamínico (PV03) que passou pelo processo de trituração no micro moinho



Fonte: Autora.

O método de análise direta apresenta vantagens como: não haver a necessidade de digerir as amostras, o que aumentaria o risco de contaminação e perda de analito por volatilização; já do ponto de vista da química verde, o método gera menos resíduos tóxicos ou corrosivos e proporciona ao analista uma menor periculosidade. Apesar dos maiores valores de RSD, ela é uma técnica que apresenta excelente sensibilidade e exatidão (KRUG; PIOVEZANI ROCHA, 2019).

É importante também avaliar se os valores de RSD são aceitáveis. Normalmente os critérios estão relacionados com o nível de concentração dos valores encontrados. Na Tabela 10 são apresentados os resultados obtidos para a quantificação de Cd, Cr e Fe em suplementos alimentares empregando o método proposto através da HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos e os RSDs correspondentes.

Tabela 10 - Concentrações de Cd, Cr e Fe em amostras de suplementos alimentares, quantificadas por HR-CS GF AAS

Código	Cd ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD	Cr (mg.kg^{-1})	RSD	Fe (mg.kg^{-1})	RSD
CE01	<LOQ	-	$0,63 \pm 0,13$	21%	275 ± 36	13%
CO01	<LOQ	-	$0,50 \pm 0,03$	5%	$20,8 \pm 32,5$	12%
CO02	<LOQ	-	$0,80 \pm 0,10$	13%	<LOQ	-
IS	<LOQ	-	$0,28 \pm 0,02$	7%	142 ± 19	13%
PV01	$91,0 \pm 32,7$	36%	$12,9 \pm 2,6$	20%	$5,72 \pm 0,66$ *	12%
PV02	121 ± 16	13%	$17,64 \pm 0,31$	17%	$2,99 \pm 0,26$ *	9%
PV03	$90,0 \pm 34,3$	38%	$4,68 \pm 0,74$	16%	$16,5 \pm 23,4$ *	14%
VD	<LOQ	-	$15,9 \pm 2,2$	14%	$6,96 \pm 0,50$ *	7%
WP01	$33,3 \pm 3,0$	9,1%	$1,82 \pm 0,18$	10%	138 ± 12	8,4%
WP02	$41,7 \pm 3,3$	7,9%	$1,07 \pm 0,13$	12%	$77,0 \pm 8,3$	11%

* g.kg^{-1}

Fonte: Autora.

Ao avaliar os dados do Quadro 1, que apresenta os critérios de aceitação para repetibilidade, ou seja, quais valores de RSD são admitidos conforme a faixa de concentração e compará-los com os valores encontrados para as amostras de suplementos alimentares. Mas também é preciso considerar que a precisão obtida depende do número de repetições realizadas e o desvio padrão relativo raramente excede valores de 10% a 15%, sendo que valores de até 20% são considerados aceitáveis em muitas situações reais, particularmente em análise de traços (BELARRA, 2002).

Avaliando os resultados obtidos para Cd, as concentrações estão na faixa de 30 a $120 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e dentro desse intervalo o valor de RSD recomendado é de 11 a 21%. As amostras PV01 e PV03 apresentaram RSDs acima do recomendado. Isso se deve ao fato de que elas são comercializadas na forma de cápsula e comprimido, respectivamente, sendo mais heterogêneas. A amostra PV02 apresenta o RSD adequado. As amostras WP01 e WP02 apresentam valores de RSD excelentes que podem ser explicados pelo fato dessas amostras serem vendidas na forma de pó, o que garante maior homogeneidade.

Ao avaliar os desvios para Cr, a maioria das amostras tem concentração entre 1 e 10mg.kg^{-1} , os RSDs deveriam ficar na faixa de 11 a 7,3%. Todas as amostras apresentaram valores maiores, com exceção das amostras CO01, IS e WP01. Já as amostras mais concentradas em Cr, com resultados maiores que 10mg.kg^{-1} , deveriam ter o desvio padrão relativo entre 7,3 a 5,3 %, os suplementos PV02 e VD, porém

apresentaram valores maiores que a faixa aceitável, novamente a explicação se deve à forma como estas amostras são distribuídas, nesse caso na forma de comprimido.

Considerando os RSDs para Fe, foram analisadas conforme a condição A as amostras CO01, IS, WP01 e WP02. O suplemento CE01 tem concentração superior a 10 mg.kg^{-1} , e deveria ter o desvio padrão relativo entre 7,3 a 5,3 %, mas foi analisado conforme a condição B, que utiliza fluxo de gás mínimo devido à alta concentração desse analito. Quando se introduz fluxo de gás durante a atomização há um aumento do ruído do sinal, o que pode levar a maiores RSDs. Os RSDs dos suplementos PV01, PV02, PV03 e VD estão fora da faixa de aceite (2,7 a 3,7 %). Eles foram analisados conforme a condição C, isto é, além de fluxo de gás mínimo, foi usado as asas do pico para a quantificação, região que naturalmente tem menor sinal e maior ruído, o que novamente, aumenta os valores de desvio padrão relativo.

5.2 Comparação com a rotulagem

A Tabela 11 exibe as quantidades de Cd, Cr e Fe por dose diária. A dose diária de cada analito foi calculada a partir das concentrações apresentadas na Tabela 10 e considerando a dose diária recomendada pelo fabricante de cada amostra. Para fins de comparação ela apresenta também a informação de Cr e Fe do rótulo de cada suplemento.

Foi encontrado Cd nas amostras de polivitamínicos em concentrações de $0,1 \mu\text{g.dose diária}^{-1}$, a amostra WP01 apresentou valores de $1,2 \mu\text{g}$ de Cd para 1 dose e $2,3 \mu\text{g}$ para 2 doses e a amostra WP02 apresentou a concentração de $1,5 \mu\text{g.dose diária}^{-1}$. As demais amostras apresentaram Cd em concentrações detectáveis, mas inferiores ao LOQ.

As amostras CO02, PV01, PV02 e VD, apresentam valores de Cr menores que os informados no rótulo. Já as amostras CE01, CO01, IS, PV03, W01 e WP02 contém cromo, mas o rótulo não informa a presença desse elemento.

Os suplementos CE01, CO01, IS contém Fe na sua composição, mas o rótulo não indica. A amostra PV01 apresenta uma concentração de Fe maior que a indicada no rótulo, já as amostras PV02 e VD os valores encontrados estão abaixo daqueles indicados no rótulo. A amostra PV03 apresenta a concentração de Fe condizente com o rótulo. A amostra CO02 apresenta Fe em concentrações inferiores ao LOQ.

Tabela 11 - Concentrações de Cd, Cr e Fe expressas como dose diárias calculadas a partir da dose diária recomendada no rótulo e os valores informados no rótulo

Código	Cd ($\mu\text{g.dose diária}^{-1}$)		Cr ($\mu\text{g.dose diária}^{-1}$)		Fe ($\text{mg.dose diária}^{-1}$)	
	Amostra	Rótulo	Amostra	Rótulo	Amostra	Rótulo
CE01	<LOQ	NI	41,0	NI	0,2	NI
CO01	<LOQ	NI	6,0	NI	0,2	NI
CO02	<LOQ	NI	8,0	33,0	<LOQ	NI
IS	<LOQ	NI	1,4	NI	0,7	NI
PV01	0,1	NI	1,4	35,0	6,3	3,5
PV02	0,1	NI	9,7	25,0	1,6	14,0
PV03	0,1	NI	2,9	NI	10,4	10,0
VD	<LOQ	NI	20,1	35,0	8,8	10,0
WP01	1,2 ^a / 2,3 ^b	NI	63,7 ^a / 127,4 ^b	NI	4,8 ^a / 9,7 ^b	NI
WP02	1,5	NI	37,5	NI	2,7	NI

NI=Não Informado, ^a 1 porção, ^b 2 porções

Fonte: Autora.

Foi avaliado também se as amostras atendem ao estabelecido na Instrução Normativa Nº 28, de 26 de julho de 2018 da ANVISA, no que diz respeito aos valores mínimos e máximos permitidos de Cr e Fe. Foi considerada a faixa etária de ≥ 19 anos. Conforme essa IN, os valores mínimos para Cr e Fe na faixa etária ≥ 19 anos são 5,25 μg e 2,7 mg e os valores máximos para Cr e Fe são 250 μg e 34,31 mg, respectivamente.

Todas as amostras que indicam a presença de Cr no rótulo estão dentro da faixa aceitável para Cr, exceto a amostra PV01 que apresenta uma dose de Cr menor que a mínima recomendada desse componente em suplementos alimentares, que é de 5,25 μg .

Com relação ao Fe, a única amostra que apresenta uma dosagem inferior a mínima recomendada é a PV02, que apresenta uma dose de 1,6 $\text{mg.dose diária}^{-1}$, enquanto o limite mínimo é de 2,7 $\text{mg.dose diária}^{-1}$.

Tendo em conta que a presente Instrução Normativa não estabelece um limite máximo para contaminantes, mas recomenda outras referências, a concentração de cádmio nos suplementos foi comparada com a Farmacopeia Brasileira. De acordo com essa fonte o limite máximo permitido de impureza de Cd é de 0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Elementos como o Cd apresentam limites bem mais baixos que os demais, devido à

elevada toxicidade. Todas as amostras apresentaram concentrações de cádmio abaixo do limite máximo permitido. Os resultados do presente estudo poderão ser relevantes para as autoridades competentes, com vista a alertar sobre possíveis contaminações por metais pesados.

6 CONCLUSÃO

Os parâmetros de mérito do método analítico desenvolvido para determinação multielementar de Cd, Cr e Fe em suplementos alimentares, utilizando a análise direta de sólidos por HR-CS GF AAS foram estabelecidos com sucesso e contemplam tanto a IN N° 28, DE 26 DE JULHO DE 2018, quanto a Farmacopeia Brasileira no que diz respeito aos valores máximos permitidos destes analitos, também foi possível aplicar o método em amostras reais de suplementos alimentares.

O método proposto é exato para a determinação de Cd, Cr e Fe em suplementos alimentares, visto que os valores encontrados para o SRM foram concordantes com os certificados.

A comparação das concentrações das amostras de suplementos alimentares obtidas por ambas as técnicas demonstra que não há diferenças estatisticamente significativas entre elas. Dessa forma, é possível afirmar que o método proposto é exato e pode ser empregado para a avaliação quantitativa de Cd, Cr e Fe presentes nesses suplementos. Também foi possível constatar que o método é preciso, visto que os valores de RSD são, na maioria $\leq 20\%$, com exceção as amostras com maior heterogeneidade.

Alguns suplementos alimentares não informam em seus rótulos sobre as concentrações de Cr e Fe presentes, mas as concentrações desses analitos se encontram dentro dos valores estipulados pela ANVISA para essa categoria e faixa etária. O trabalho também evidenciou a presença de Cd em algumas amostras, os quais ficaram abaixo do limite máximo permitido pela farmacopeia.

REFERÊNCIAS

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. [s. l.], 2020.

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ORIENTAÇÕES GERAIS SOBRE OS REQUISITOS DA ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. [s. l.], v. 087, 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. [s. l.], v. I, 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN Nº 28, de 26 de Julho de 2018. **Diário Oficial da União (DOU) nº144**, [s. l.], n. 1, 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 243, DE 26 DE JULHO DE 2018. **Diário Oficial da União (DOU) nº144**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–8, 2018.

AOAC, International. Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **International AOAC**, [s. l.], 2016.

AVULA, Bharathi *et al.* Quantitative Determination of Multiple Elements in Botanicals and Dietary Supplements Using ICP-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 16, p. 8887–8894, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf101598g>.

BALARAM, M A; RESANO, M; F. VANHAECKE, L. Moens. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 828–839, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.001>.

BELARRA, M A. Direct solid sampling with electrothermal vaporization / atomization : what for and how ?. [s. l.], v. 21, n. 12, p. 828–839, 2002.

BORGES, Daniel L Gallindo *et al.* Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, [s. l.], v. 1, n. 18, p. 58–67, 2005.

HEITMANN, U. *et al.* Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, [s. l.], v. 51, n. 9–10, p. 1095–1105, 1996.

KRUG, Francisco José; PIOVEZANI ROCHA, Rodrigo Fábio. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2. ed. São Paulo: EditSBQ, 2019.

MARRERO, Julieta *et al.* Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: Are the concentrations declared in the labels accurate?. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 108, p. 81–86, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.12.013>.

POLETTI, Jucelaine *et al.* Toxic and micronutrient elements in organic , brown and polished rice in Brazil. **Food Additives & Contaminants**, [s. l.], v. 7, n. November 2014, p. 63–67, 2014.

RAYA-RODRIGUEZ, M T; DE MEDEIROS ALBANO, F. **Validação e garantia da qualidade de ensaios**. 2ªed. Porto Alegre: REDE DE METROLOGIA, 2015.

RESANO, Martín; ARAMENDÍA, Maite; BELARRA, Miguel A. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: A tutorial review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 2229–2250, 2014.

UDOUSORO, Imaobong; IKEM, Abua; AKINBO, Olujide T. Content and daily intake of essential and potentially toxic elements from dietary supplements marketed in Nigeria. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 62, p. 23–34, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.017>.

WELZ, Bernhard *et al.* Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry: Past, Present and Future Aspects – A Critical Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 799–821, 2014.