

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ZINCO,  
CÁDMIO, CHUMBO, COBRE, SELÊNIO E  
MANGANÊS EM OVOS DE GALINHA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**BRUNA AVILA WIETHAN**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

# **DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ZINCO, CÁDMIO, CHUMBO, COBRE, SELÊNIO E MANGANÊS EM OVOS DE GALINHA**

**por**

**Bruna Avila Wiethan**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ZINCO, CÁDMIO, CHUMBO,  
COBRE, SELÊNIO E MANGANÊS EM OVOS DE GALINHA**

elaborada por  
**Bruna Avila Wiethan**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

*Paulo Cícero do Nascimento*

---

**Paulo Cícero do Nascimento, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

*Carine Viana Silva*

---

**Carine Viana Silva, Dr (UFSM)**

*Simone Stulp*

---

**Simone Stulp, Dr (UNIVATES)**

**Santa Maria, 13 de Março de 2014**

**À minha família,  
pelo incentivo e carinho,  
dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, pela orientação, paciência e confiança ao longo da iniciação científica e mestrado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carine Viana Silva e ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho pelas contribuições feitas em meu exame de qualificação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Bohrer, pela contribuição a este e a tantos outros trabalhos desenvolvidos no Lachem.

Aos meus pais Jarbas Wiethan e Ires Wiethan, pela dedicação, confiança, apoio, educação, exemplo e amor que sempre me proporcionaram, e cujos estímulos foram fundamentais para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida.

As minhas irmãs Gabriela, Julia e Laura, pelo carinho incondicional e pelas alegrias sempre proporcionadas. Vocês são imprescindíveis em minha vida.

Aos queridos amigos Alexsandro Colim, Ananda Guarda, Alexandre Schneider e Thaís Dal Molin, pelas risadas, conselhos, força e principalmente pela paciência. Sem a amizade de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos colegas do Lachem pela harmoniosa convivência e pelos momentos de descontração vividos.

À todos os funcionários e professores que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade oferecida de realizar os cursos de Graduação e Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Deus...

Muito Obrigada.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ZINCO, CÁDMIO, CHUMBO, COBRE, SELÊNIO E MANGANÊS EM OVOS DE GALINHA**

AUTORA: BRUNA AVILA WIETHAN

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 13 de março de 2014

A qualidade dos produtos alimentares merece grande atenção devido à influência que exercem na nutrição e saúde humana. Os alimentos são a fonte primária de elementos essenciais para os seres humanos, mas também a principal fonte de exposição a elementos tóxicos. Neste contexto, foi desenvolvido um método voltamétrico que permite a determinação de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês em ovos de galinha. Isto porque os ovos estão entre os alimentos mais importantes e nutritivos da dieta, sendo consumidos rotineiramente pela população. Uma vez que a análise direta da matriz é impossibilitada devido ao elevado teor de gordura da amostra, foram avaliados três diferentes tipos de pré-tratamento da mesma: digestão ácida, digestão por irradiação UV e formação de emulsão. O método desenvolvido permitiu determinações simultâneas e sequenciais, análise de especiação, apresentando ainda ampla faixa linear para os analitos e baixos limites de detecção e quantificação. Os níveis médios de concentração encontrados nas amostras foram de 10,54 mg kg<sup>-1</sup> para o Pb, 7,4 µg kg<sup>-1</sup> para Cd, 0,02 mg kg<sup>-1</sup> para Pb, 3,78 mg kg<sup>-1</sup> para Cu, 0,530 mg kg<sup>-1</sup> para Mn e 0,972 mg kg<sup>-1</sup> para Se. A exatidão do método foi avaliada a partir da análise do material de referência certificado (SRM 8415 – Whole Egg Powder). Medidas comparativas das amostras por espectrometria de absorção atômica (GF AAS), técnica geralmente empregada para análise da referida amostra, permitiram a verificação da equivalência dos métodos.

Palavras-chave: Ovos, minerais, voltametria, tratamento de amostra.

## **ABSTRACT**

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Chemistry  
Universidade Federal of Santa Maria

### **VOLTAMETRIC DETERMINATION OF ZINC, CADMIUM, LEAD, COPPER, MANGANESE AND SELENIUM IN CHICKEN EGGS**

AUTHOR: BRUNA AVILA WIETHAN

ADVISOR: PROF. Dr. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO

PLACE AND DATE OF THE PRESENTATION: Santa Maria, March 13<sup>th</sup>, 2014.

The quality of the food deserves great attention due to its influence on human nutrition and health. Food is the primary source of essential elements for humans, but also the main source of exposure to toxic elements. In this context, we developed a voltammetric method that allows the determination of zinc, cadmium, lead, copper, selenium and manganese in chicken eggs. This is because the eggs are among the most important and nutritious food in the daily diet, being routinely consumed by the population. Since the direct analysis of the array is impossible due to the high fat content of the sample were evaluated three different types of pre-treatment of same: acid digestion, digestion by UV irradiation and emulsion formation. The developed method allowed simultaneous and sequential determinations, speciation analysis, wide range linear for the analytes and low limits of detection and quantification. The average levels of concentration found in the samples were 10,54 mg kg<sup>-1</sup> of Zn, 0.0074 mg kg<sup>-1</sup> of Cd, 0.02 mg kg<sup>-1</sup> of Pb, 3.78 mg kg<sup>-1</sup> of Cu, 0,972 mg kg<sup>-1</sup> of Se, and 0,530 mg kg<sup>-1</sup> of Mn The accuracy of the method was evaluated through the analysis of certified reference material (SRM 8415 - Whole Egg Powder). Comparative measurements of the samples by atomic absorption spectrometry ( GF AAS ) technique commonly used for analysis of that sample, allowed verifying the equivalence of the methods.

Keywords: Eggs, minerals, voltammetry, treatment of sample

## LISTA FIGURAS

- Figura 1: Voltamograma obtido na determinação de selênio. Solução de medida: 10mL de água Milli-Q, 50 $\mu$ L de amostra emulsionada de ovo de galinha, 0,05M de KCl, adições crescentes (10,20,30  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) do padrão de Se(IV).....33
- Figura 2: Voltamograma de redissolução anódica obtido na análise simultânea de Zn(II), Cd(II), Pb(II) e Cu(II) .....35
- Figura 3: Efeito do potencial de pré-concentração na corrente de pico para 10 $\mu$ g L<sup>-1</sup> de Se(IV). Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q, 10 $\mu$ g L<sup>-1</sup> de Se(IV), 1mg L<sup>-1</sup> de Cu(II).....36
- Figura 4: Efeito do tempo de pré-concentração na corrente de pico para 10 $\mu$ g L<sup>-1</sup> de Se(IV). Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q, 10 $\mu$ g L<sup>-1</sup> de Se(IV), 1mg L<sup>-1</sup> de Cu(II).....36
- Figura 5: Voltamograma de redissolução catódica obtido sequencialmente, para concentrações crescentes (10, 20 e 30  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) de Se(IV). Potencial de deposição = -450 mV, tempo de deposição = 120 s.....37
- Figura 6: Efeito do potencial de pré-concentração na corrente de pico do Mn(II). Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q, 10 $\mu$ g L<sup>-1</sup> de Mn(II), 0,05M de ácido acético/hidróxido de amônio (pH 10).....38
- Figura 7: Efeito do tempo de pré-concentração na corrente de pico do Mn(II). Potencial de deposição = -1700 mV. Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q, 10 $\mu$ g L<sup>-1</sup> de Mn(II), 0,05 M de ácido acético/hidróxido de amônio (pH 10).....38
- Figura 8: Voltamograma de redissolução anódica obtido de forma sequencial, para concentrações crescentes (10,20,30  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) de Mn(II). Potencial de deposição = -1700 mV, tempo de deposição = 200 s, 0,05 M de ácido acético/hidróxido de amônio (pH 10) como eletrólito suporte.....39
- Figura 9: Efeito da concentração de Cu(II) na corrente de pico para 20 $\mu$ g L<sup>-1</sup> Se(IV).....41
- Figura 10: Gráficos de ensaios de regressão obtidos através das concentrações de Zn, Cd, Pb, Cu, Se e Mn nas amostras de ovos de galinha por voltametria e AAS.....47

## LISTA TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de operação do espectrômetro de absorção atômica equipado com forno de grafite (GF AAS) para a análise das amostras de ovos.....	26
Tabela 2: Condições voltamétricas otimizadas para a determinação de cádmio, chumbo, cobre, manganês, selênio e zinco.....	40
Tabela 3: Recuperações obtidas para amostra certificada (SRM 8415 – Whole Egg Powder) após digestão ácida.....	44
Tabela 4: Recuperações obtidas para amostra certificada (SRM 8415 – Whole Egg Powder) após digestão UV.....	44
Tabela 5: Recuperações obtidas para amostra certificada (SRM 8415 – Whole Egg Powder) que recebeu tratamento emulsionado.....	44
Tabela 6: Valores encontrados para os limites de detecção, quantificação e faixa linear.....	45
Tabela 7: Concentrações médias ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Zn, Cd, Pb, Cu, Se e Mn, encontradas nas seis amostras de ovos de galinha analisadas por voltametria e absorção atômica.....	47
Tabela 8: Concentrações de Se(IV) e Se(VI) encontradas nas amostras após análise de especiação.....	51

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b>AAS</b>	Atomic absorption spectrometry
<b>AdSV</b>	Adsorptive stripping voltammetry
<b>ASV</b>	Anodic stripping voltammetry
<b>CPE</b>	Carbon past electrode
<b>CSV</b>	Cathodic stripping voltammetry
<b>DME</b>	Dropping mercury electrode
<b>E<sub>amp</sub></b>	Amplitude do potencial de pulso
<b>E<sub>d</sub></b>	Potencial de deposição (pré-concentração)
<b>GCE</b>	Glassy carbon electrode
<b>HMDE</b>	Hanging Mercury drop electrode
<b>ICP-MS</b>	Inductively coupled plasma – mass spectrometry
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MME</b>	Multi mode mercury electrode
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>SMDE</b>	Static mercury drop electrode
<b>t<sub>d</sub></b>	Tempo de deposição (pré-concentração)
<b>v</b>	Velocidade de varredura dos potenciais

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVO</b> .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>3.1 Qualidade dos ovos de galinha</b> .....	14
<b>3.2 Importância dos elementos estudados</b> .....	17
3.2.1 Cobre.....	17
3.2.2 Zinco.....	18
3.2.3 Selênio.....	19
3.2.4 Manganês.....	20
3.2.5 Cádmio.....	21
3.2.6 Chumbo.....	22
<b>3.3 Polarografia e Voltametria</b> .....	23
3.3.1 Voltametria de Redissolução.....	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>4.1 Instrumentação</b> .....	26
<b>4.2 Reagentes e Soluções</b> .....	27
<b>4.3 Tratamento das amostras</b> .....	27
4.3.1 Abertura ácida.....	27
4.3.2 Digestão por irradiação UV.....	28
4.3.3 Emulsificação das amostras.....	28
<b>4.4 Procedimento analítico</b> .....	29
4.4.1 Determinação de Zinco, Cádmio, Chumbo e Cobre.....	29
4.4.2 Determinação de Selênio.....	29
4.4.3 Determinação de Manganês.....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>5.1 Pré-tratamento das amostras</b> .....	31
<b>5.2 Análise por voltametria</b> .....	35
<b>5.3 Parâmetros de validação</b> .....	42
<b>5.4 Aplicação do método em amostras</b> .....	46
<b>5.5 Análise de especiação de selênio</b> .....	50
<b>5.6 Análise crítica dos tratamentos empregados</b> .....	51
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	53
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

## 1. INTRODUÇÃO

Os alimentos são fonte primária de elementos essenciais para os seres humanos, mas também a principal fonte de exposição a elementos tóxicos. Neste contexto, o conhecimento da composição mineral dos alimentos é de suma importância, principalmente em produtos alimentares consumidos rotineiramente (IEGGLI et al, 2010; NARDI et al, 2009).

Oligoelementos essenciais como zinco (Zn), cobre (Cu), selênio (Se) e manganês (Mn) desempenham um importante papel na biologia humana e são indispensáveis para as mais diversas funções metabólicas. Já elementos como chumbo (Pb) e cádmio (Cd) são classificados como metais pesados potencialmente tóxicos, uma vez que estes elementos ao serem ingeridos, mesmo em baixas concentrações, mas por um longo período, apresentam efeitos bastante prejudiciais ao organismo (NARDI et al, 2009).

O conhecimento da composição mineral de ovos de galinha se faz necessário, uma vez que assim, podemos estimar o valor nutricional dos ovos, a qualidade do desenvolvimento embrionário e ainda, utilizá-los como bioindicadores de poluição (GIANNENAS et al, 2009).

Sendo assim, o desenvolvimento de métodos analíticos que possibilitem a determinação de diferentes analitos na matriz em questão, se torna fundamental. Atualmente, a Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) é a técnica utilizada para avaliar o teor de minerais na referida matriz. No entanto, além de ser relativamente cara, esta técnica não permite a determinação simultânea dos elementos. Desta forma, o desenvolvimento de métodos eletroquímicos de análise, como a voltametria, traz vantagens frente ao método convencional, uma vez que permite análises simultâneas e sequenciais, análise de especificação, apresenta alta sensibilidade, seletividade e é economicamente viável.

As técnicas eletroquímicas, porém, são extremamente sensíveis à presença de matéria orgânica, o que torna indispensável o adequado tratamento da amostra. Devido ao alto teor de viscosidade e matéria orgânica, que torna o ovo uma matriz complexa, é bastante importante que se pesquise a melhor forma de pré-tratamento desta amostra, uma vez que o sucesso da análise depende deste tratamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver um método voltamétrico que permita a determinação de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês em amostras de ovos de galinha, através do estudo da melhor forma de pré-tratamento da amostra.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar como forma de pré-tratamento da amostra a digestão ácida, a digestão UV e a formação de emulsão;
- Comparar os resultados obtidos por voltametria com a técnica de absorção atômica (GF AAS);
- Fazer a especiação de selênio, através da determinação das espécies de Se IV e Se VI presentes nas amostras.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Qualidade dos ovos de galinha

O ovo é uma das melhores e mais baratas fontes de proteína de alta qualidade, contendo também quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, minerais, vitaminas e gorduras. Os ovos de galinha, além de fornecerem à dieta humana, todos os nove aminoácidos essenciais são utilizados como referência para comparação proteica de outros alimentos (HERRON & FERNANDEZ, 2004; KASSIS et al, 2010; SARCINELLI et al, 2007).

Em muitos países o consumo de ovos diminuiu devido à percepção que a população tem sobre seu elevado teor de colesterol. No entanto, estudos sugerem que não há uma ligação direta entre o consumo deste alimento e os níveis de colesterol no sangue (LEE & GRIFFIN, 2006; QURESHI et al, 2007; NIMALARATNE et al, 2011).

Estratégias têm sido exploradas na formulação das dietas das aves de postura, modificando a composição de lipídios e aumentando o conteúdo de vitaminas e minerais, visando melhorar o valor nutritivo dos ovos, tornando-os enriquecidos com nutrientes específicos (KASSIS et al, 2010).

Os minerais tem papel fundamental na alimentação das aves, uma vez que participam de todos os processos bioquímicos corporais, dentre os quais podemos destacar a formação da casca do ovo e melhor qualidade interna deste (SECHINATO et al, 2006). Há muitos anos os nutricionistas utilizam minerais na forma inorgânica, buscando atender as exigências minerais das aves. No entanto, estando na forma iônica, os minerais podem se complexar com outros componentes da dieta, dificultando a absorção ou tornando-os indisponíveis. Tendo em vista estas incertezas, os teores de minerais oferecidos na dieta são superiores aos níveis exigidos, resultando em excesso de fornecimento, excesso de excreção e, por conseqüência, poluição do meio ambiente (ARAÚJO et al, 2008). Além disso, a possibilidade de contaminação de fontes minerálicas inorgânicas com metais

pesados (As, Cd e Pb) tem sido registrados (McCARTNEY, 2008; RUTZ & MURPHY, 2009).

Por outro lado, a deficiência de minerais no organismo de poedeiras acarretam a produção de ovos empobrecidos em minerais. Os níveis de minerais presentes em ovos dependerão da forma química do mineral e da quantidade destes introduzidos na dieta das aves (RICHARDS, 1997).

Fontes orgânicas ou quelatos de minerais (minerais ligados à proteínas ou aminoácidos) tem sido usados devido a perspectiva de serem mais biodisponíveis. Já se sabe que as fontes orgânicas/quelatadas dos minerais diminuem a poluição ambiental, por exemplo, por serem melhor absorvidos e portanto, menos excretados. No entanto, ainda não se pode afirmar que a suplementação com formas orgânicas trazem benefícios à produção e qualidade dos ovos, portanto mais estudos devem ser realizados nesse sentido (SECHINATO et al, 2006; NOLLET et al, 2007).

Pesquisas também indicam que a qualidade dos ovos de galinha pode ser influenciada por fatores como condições de manejo, instalações e ambiente em que vivem as aves. (KÜÇÜKYILMAZ et al, 2012). Todos esses parâmetros contribuem para que este alimento chegue à mesa do consumidor com elevado valor nutricional.

Alguns trabalhos visando o conhecimento da composição mineral dos ovos de galinha tem buscado entender cada vez mais o papel deste alimento na nutrição e saúde humanas (GIANNENAS et al, 2009; KOVACS-NOLAN et al, 2005; KILIÇ et al, 2002).

Giannenas e colaboradores (2009) investigaram o conteúdo de diversos minerais traços presentes na gema e albúmen de ovos de galinha por ICP-MS (do inglês Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry). As amostras sofreram um processo de digestão ácida seguida por aquecimento de microondas. O método apresentado mostrou boa recuperação com valores entre 89 e 111% e baixos limites de detecção. Os autores concluíram que o tipo de criação das aves (convencional, orgânico ou pátio) tem influência na concentração de minerais encontradas nos ovos. As aves de pátio apresentaram ovos com menor conteúdo mineral, provavelmente por não receberem nenhum tipo de suplemento mineral na alimentação. O trabalho também relatou maior presença de minerais nas gemas do que no albúmen.

Nardi e colaboradores (2009) fizeram a análise de minerais em alimentos, inclusive em ovos em pó, também por ICP-MS com o processo de digestão da

amostra em fornos de microondas equipados com vasos de PTFE (politetrafluoretileno). Ao realizarem a comparação da metodologia proposta com a técnica de GF AAS, observaram que os resultados obtidos por ambas as técnicas analíticas apresentavam concordância e bons limites de detecção.

Kiliç e colaboradores (2002) fizeram a análise de diversos metais em ovos por absorção atômica com o objetivo de encontrar o melhor modificador químico para tal análise. Este interesse surgiu devido a perdas de elementos voláteis durante o processo de atomização, dificultando a análise por absorção atômica.

leggli e colaboradores (2010) destacaram a importância de se conhecer a composição mineral dos ovos de galinha para avaliar o papel destes na alimentação humana, através do emulsionamento da amostra. O método desenvolvido com emulsificação da amostra para posterior análise apresentou-se simples, com pouco uso de reagentes quando comparado a outras formas de digestão e possibilitou o uso de padrões aquosos para a calibração.

Uluozlu e colaboradores (2009) tendo em vista o elevado consumo de derivados de frango na Turquia investigaram o perfil mineral de ovos e diferentes partes dos frangos. Após digestão por micro-ondas, as amostras foram analisadas por AAS. De acordo com os autores, os níveis de chumbo eram superiores aos limites recomendados.

Embora ainda existam poucos estudos sobre a composição mineral de ovos de galinha, pode-se observar que praticamente todos empregam a espectroscopia como técnica de análise desta matriz. Ao lançar mão de técnicas eletroanalíticas podemos diminuir os custos de análise, reduzir o tempo das mesmas e ainda obter informações a cerca das espécies dos analitos, tudo isso sem perda de sensibilidade.

No próximo item, uma breve revisão sobre a importância ou risco dos elementos Zn, Cd, Pb, Cu, Se e Mn para o organismo, resgata a necessidade de se conhecer os teores destes elementos em ovos, uma vez que este alimento é consumido corriqueiramente em todo país.

## 3.2 Importância dos elementos estudados

### 3.2.1 Cobre

O cobre (Cu) é um elemento traço essencial para os organismos vivos, sendo parte integrante do metabolismo oxidativo mitocondrial. Promove a fosforilação e a desintoxicação dos radicais livres, síntese de neurotransmissores, formação de pigmentação, síntese do tecido conjuntivo e metabolismo do ferro (CRISPONI et al, 2010; UNDERWOOD, 1999).

Os átomos de cobre estão envolvidos como cofatores de diferentes enzimas redox. Entre elas: a citocromo C oxidase, a superóxido dismutase e a lisil –oxidase. O cobre é essencial para a reprodução, a regulação da expressão gênica, e para o crescimento e desenvolvimento normais (CRISPONI et al, 2010; YRUELA, 2005). A utilidade biológica de cobre deriva principalmente da aptidão deste em alternar entre as formas oxidadas e reduzidas, sendo por esta razão, utilizado por um grande número de enzimas (provavelmente mais que 300 em seres humanos) envolvidas em reações redox (BARCELOS, 2008).

Os mecanismos celulares e bioquímicos pelos quais o armazenamento de cobre induz dano e necrose celular ainda é debatido. Sabe-se que o excesso de cobre pode provocar danos às células pela produção de espécies reativas de oxigênio, ROS, e conseqüentemente lesões oxidativas. Isto porque este íon promove a reação de Fenton, que leva a produção de radicais hidroxila, e estes por sua vez desencadeiam uma serie de reações de oxidação-redução, levando a perda da integridade celular (BARCELOS, 2008).

A Doença de Wilson e a Doença de Menkes são ocasionadas pelo excesso ou deficiência de cobre no metabolismo humano, respectivamente. O cobre em excesso também pode induzir toxicidade indiretamente pela interação com outros nutrientes, por exemplo, o desenvolvimento de anemia pela interferência que causa no transporte e/ou metabolismo do ferro (BARCELOS, 2008; SALEMPERA, 1997).

### 3.2.2 Zinco

Recentes pesquisas experimentais e clínicas têm reforçado a importância do zinco (Zn) na saúde humana. O zinco possibilita várias funções bioquímicas, pois é componente de inúmeras enzimas, dentre estas, álcool desidrogenase, superóxido dismutase, anidrase carbônica, fosfatase alcalina e enzimas do sistema nervoso central (TORRES, 1969). Participa na divisão celular, expressão genética, processos fisiológicos como crescimento e desenvolvimento, na transcrição genética, na morte celular, age como estabilizador de estruturas de membranas e componentes celulares, além de participar da função imune e desenvolvimento cognitivo. Sua deficiência pode causar alterações fisiológicas como, hipogonadismo, danos oxidativos, alterações do sistema imune, hipogeusia, danos neuropsicológicos e dermatites (MAFRA & COZZOLINO, 2004).

O zinco está envolvido na estabilização de membranas estruturais e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica. O papel fisiológico do Zn como antioxidante é evidenciado por 2 mecanismos: proteção de grupos sulfidrilas contra oxidação e na inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por metais de transição como ferro e cobre. O zinco participa da estrutura da superóxido dismutase (SOD), sendo a atividade desta enzima reduzida pela deficiência deste mineral. Há evidências de que a suplementação com Zn reduz o impacto de muitas doenças, pois promove melhora do sistema imune (MAFRA & COZZOLINO, 2004; SECHINATO et al, 2006).

Mariscos, ostras, carnes vermelhas, fígado, miúdos e ovos são consideradas as melhores fontes de zinco (MAFRA & COZZOLINO, 2004).

Na deficiência de Zn ocorre também diminuição da atividade de diversas enzimas. A deficiência moderada de zinco causa retardo no crescimento, diarreia, pneumonia, além de prejuízos no desenvolvimento cerebral. Sua deficiência está relacionada, ainda, com o aumento da suscetibilidade a infecções. Defeitos na síntese ou prejuízo da função do RNA mensageiro parecem ser induzidos pela deficiência de zinco. Seu excesso no organismo, todavia, pode causar hiperglicemia, além de afetar fígado e intestino (MAFRA & COZZOLINO, 2004; SECHINATO et al, 2006).

### 3.2.3 Selênio

O micromineral selênio (Se) é cofator de enzimas e proteínas com vital importância na defesa antioxidante, função nos hormônios da tireóide e insulina, regulação do crescimento celular e manutenção da fertilidade (BROWN & ARTHUR, 2001).

Este mineral pode ser encontrado com frequência em associação com o enxofre em compostos orgânicos e inorgânicos devido às propriedades similares que apresenta com este outro elemento (LEESON & SUMMERS 2001).

Uma das principais funções do selênio é a participação do elemento na enzima glutathiona peroxidase que oxida a glutathiona e destrói peróxidos, prevenindo o ataque destes aos ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas lipídicas. Da mesma maneira que protege as membranas celulares dos radicais livres, há também a proteção das membranas das mitocôndrias e dos microssomas. Uma vez que é componente da enzima glutathiona peroxidase, responsável por neutralizar radicais livres, desempenha importante papel na prevenção do câncer. Todas essas ações anti-oxidativas do selênio dependem da sua interação com a vitamina E, tendo os dois ação essencial nos mecanismos de defesa (BROWN & ARTHUR, 2001).

A interdependência selênio/vitamina E tem diversas vantagens para o organismo, como a preservação da integridade do pâncreas, permitindo a digestão normal de gordura e a absorção da vitamina E que é lipossolúvel, destruição dos peróxidos, reduzindo a quantidade de vitamina E necessária para manter a integridade da membrana e a conservação desta vitamina por mais tempo no plasma (LEESON & SUMMERS 2001).

O selênio também é conhecido por proteger o organismo dos efeitos tóxicos do mercúrio e é fundamental para o funcionamento dos hormônios da tireóide e insulina, regulação do crescimento celular e fertilidade (SAVORY & WILLIS, 1992; LESSON & SOMER, 2001).

A deficiência deste elemento no organismo aumenta a probabilidade de desenvolvimento de cânceres e seu excesso é prejudicial uma vez que pode interferir no metabolismo do enxofre (LESSON & SOMER, 2001).

Embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam totalmente elucidados, é bem estabelecido que o selênio da dieta é bastante importante para uma resposta imunitária saudável. A deficiência de selênio pode reduzir a contagem de células T (principais tipos de células que medeiam a erradicação de toxinas, cuja síntese e ativação parecem ser Se-dependentes), prejudicando a proliferação de linfócitos e capacidade de resposta do organismo. A constante formação de novas células para substituir aquelas perdidas requer uma oferta extremamente eficiente de Se para manter a grande demanda de linfócitos ativos (BROWN & ARTHUR, 2001).

### 3.2.4 Manganês

O manganês (Mn) é responsável pela ativação de várias enzimas, entre elas quinases, hidrolases, transferases e descarboxilases. Também é necessário para a fosforilação oxidativa na mitocôndria, para a síntese de ácidos graxos e incorporação de acetato no colesterol (UNDERWOOD, 1999; LEESON & SUMMERS, 2001).

Apesar de ser amplamente distribuído no organismo, é encontrado em baixas concentrações nas células e tecidos, mas fundamental para o desenvolvimento normal dos ossos e para a manutenção do processo reprodutivo em machos e fêmeas (UNDERWOOD, 1999).

Este mineral ativa o grupo de enzimas glicosiltransferases que são necessárias para a síntese do sulfato de condroitina, um constituinte extracelular da cartilagem que contribui para que as zonas de crescimento resistam a cargas compressivas (SECHINATO et al, 2006; LEACH, 1986).

O Mn também está envolvido na manutenção do tecido conjuntivo e do crescimento ósseo, além de participar do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Este elemento é necessário para que ocorra a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Compõe a enzima SOD, integrando o sistema de defesa do organismo contra radicais livres (LEESON & SUMMERS, 2001).

A carência deste metal está relacionada a distúrbios no crescimento e formação óssea, e seu excesso pode provocar anemia, reduzindo a absorção do ferro, além de afetar os sistemas reprodutivo e respiratório (SALMENPERA, 1997).

### 3.2.5 Cádmiu

O cádmio (Cd) está entre os elementos mais tóxicos existentes na natureza (AL-KEDHAIRY et al, 2001). Sabe-se que são as atividades antropogênicas que liberam as quantidades mais preocupantes de cádmio no meio ambiente, como: mineração, atividades metalúrgicas, queima de combustíveis fósseis, incineração do lixo, adição de pesticidas e fertilizantes fosfatados, uso do lodo de esgoto ou a produção, uso e dejetos de baterias (LAGRIFFOUL et al, 1998).

Em vista do perigo da acumulação crônica de Cd no corpo humano, os fatores que influenciam sua concentração nos componentes da dieta humana são de grande importância (PIERANGELI et al, 2007). A principal causa da toxicidade do cádmio, assim como ocorre nas plantas, parece estar relacionada à sua combinação com grupos tiólicos (-SH) de enzimas e proteínas, o que provoca desarranjos no metabolismo (OMS, 1998; REILLY, 1991).

Este elemento é tóxico ao homem quando ingerido ou inalado, pois pode ser depositado e acumulado em vários tecidos do corpo. Não é um elemento essencial na alimentação humana, sendo os alimentos contaminados a fonte mais importante de ingestão deste metal (SALGADO 1996).

No corpo humano 70% do cádmio em circulação são encontrados em células sanguíneas. Parte apresenta-se ligado a metalotioneína e o restante circulando sob a forma livre. Cerca de 50% de carga corporal deste metal se depositam nos rins, sendo este considerado o órgão crítico da intoxicação por Cd, o que leva primordialmente a uma lesão renal (TAVARES & CARVALHO, 1992).

Sendo um veneno cumulativo, o Cd deposita-se nos tecidos do corpo, e em casos agudos, a doença é identificada como Cadmiose: além dos efeitos renais, pode ser considerado um elemento etiológico para várias patologias no homem, incluindo tumores nos testículos, hipertensão arterial, arteriosclerose e doenças crônicas do envelhecimento (WHO 1998).

A International Agency for Research on Cancer, em 1993, classificou o cádmio e seus compostos como grupo 1 de carcinógenos humanos. Em 1988, o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) reconheceu que “existe somente uma pequena margem de segurança entre a exposição normal pela dieta e a exposição que produz efeitos deletérios” (WHO 2000; WHO 2004).

### 3.2.6 Chumbo

O chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo. Sua toxicidade resulta, principalmente, de sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio, que funcionam como doadores de elétrons. Os efeitos biológicos do chumbo são os mesmos qualquer que seja a rota de entrada (inalação ou ingestão), uma vez que há interferência no funcionamento normal da célula e em inúmeros processos fisiológicos (MOREIRA & MOREIRA, 2004; REILLY, 1991; PAN et al, 2010).

O conjunto de órgãos mais sensível ao envenenamento por chumbo é o sistema nervoso, sendo que a encéfalopatia é um dos mais sérios desvios tóxicos induzidos pelo chumbo em crianças e adultos. Além da ausência de um limite preciso, a toxicidade do chumbo na infância pode ter efeitos permanentes, tais como menor quociente de inteligência e deficiência cognitiva (MOREIRA & MOREIRA, 2004).

Os mecanismos dos efeitos neurotóxicos do chumbo não são bem conhecidos, porém existem indicações de distúrbios no metabolismo do carboidrato, síntese anormal de nucleotídeos, inibição da respiração celular, bloqueio dos grupamentos -SH neuronais e mudanças nos níveis de ácido neuramínico e RNA (MOREIRA & MOREIRA, 2004).

A anemia é uma descoberta extraordinária no envenenamento por chumbo, não estando necessariamente associada com deficiência de ferro. Os desvios hematológicos que levam à anemia pelo chumbo são considerados como resultado de sua ação tóxica sobre as células vermelhas e eritropoiéticas na medula óssea (MOREIRA & MOREIRA, 2004).

Diversas pesquisas têm sugerido que o crescimento físico e a estatura das crianças podem ser reduzidos pela exposição ao chumbo. A exposição excessiva e prolongada também pode causar doença renal progressiva e irreversível. Sua toxicidade está também associada à esterilidade, abortos e mortalidade neonatal, porém, as evidências são principalmente qualitativas, e não foram estabelecidas relações de dose-resposta (MOREIRA & MOREIRA, 2004; JUBERG, 1997).

As manifestações clínicas podem aparecer tanto na forma crônica produzindo anorexia, náuseas, vômitos, dores abdominais diversas, paralisia, disfunção cerebral, distúrbios visuais, anemia, convulsões e palidez, quanto na forma aguda, caracterizada por queimadura na boca, sede intensa, inflamação no trato gastrointestinal ocasionando diarréias e vômitos. Os sintomas de envenenamento por chumbo compreendem resumidamente danos aos sistemas hematopoético, nervoso, gastro-intestinal e renal (REILLY, 1991).

### 3.3 Polarografia e Voltametria

Polarografia e voltametria são denominações para técnicas analíticas, as quais se relacionam com medidas de corrente-potencial em uma célula eletroquímica. O sinal analítico é a corrente que flui através da célula junto a uma reação do analito no eletrodo de trabalho. O conceito polarografia é sempre utilizado quando a curva corrente x voltagem é registrada com um eletrodo de trabalho, cuja superfície é continuamente renovada. A isto pertence o clássico eletrodo de trabalho de mercúrio gotejante (DME, do inglês *Dropping Mercury Electrode*) e de gota de mercúrio estática (SMDE, do inglês *Static Mercury Drop Electrode*). Todos os outros métodos são classificados como voltametria, para os quais se utilizam eletrodos de trabalho estacionários, como eletrodos de gota de mercúrio pendente (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*), de filme de mercúrio (TMFE do inglês *Thin Mercury Film Electrode*), de carbono vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*), de pasta de carbono (CPE, do inglês *Carbon Past Electrode*) e, ainda, eletrodos de trabalho de metais nobres, como ouro e platina, entre outros tipos de eletrodo. (HENZE, 2001)

A técnica voltamétrica se baseia no registro de curvas corrente-potencial, obtidas pela eletrólise de uma determinada espécie química, para assim obter informações qualitativas e quantitativas a cerca desta espécie (ALEIXO, 2003). Esta eletrólise é feita em uma célula eletroquímica constituída de três eletrodos. Um dos três eletrodos é o eletrodo de trabalho, cujo potencial em relação a um eletrodo de referência varia linearmente com o tempo. As dimensões do eletrodo de trabalho são mantidas pequenas para aumentar sua tendência em se tornar polarizado. O

eletrodo de referência tem um potencial que permanece constante durante o experimento. O terceiro eletrodo é um contra-eletrodo (freqüentemente um fio de platina). Na célula, a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. (HARRIS, 2005)

O potencial aplicado no eletrodo de trabalho faz com que o analito troque elétrons na superfície do mesmo, se reduzindo ou se oxidando. O consumo do analito, em virtude da pequena área superficial do eletrodo, é desprezível.

A corrente medida é a soma das correntes individuais, tais como a corrente capacitiva ( $i_c$ ), resultante da formação da dupla camada elétrica na interface eletrodo-solução e a corrente faradaica ( $i_f$ ), resultante da troca de elétrons entre o analito e o eletrodo. (HARRIS, 2005)

### 3.3.1 Voltametria de redissolução

A voltametria de redissolução (do inglês *Stripping Voltammetry*) é a técnica eletroquímica mais capacitada para a análise de traços e análise de especiação. A grande sensibilidade e seletividade se baseiam na pré-concentração do analito anterior a sua determinação (HENZE & THOMAS, 2001). Devido a pré-concentração e a determinação ocorrerem no mesmo eletrodo e sem troca de recipiente, o surgimento de erros sistemáticos seguidos de contaminações ou perdas de analito são bem menores.

Durante a determinação os analitos pré-concentrados são redissolvidos na solução a partir do eletrodo de trabalho. A voltametria de redissolução é subdividida em voltametria de redissolução catódica (CSV, do inglês *Cathodic Stripping Voltammetry*), voltametria de redissolução anódica (ASV, do inglês *Anodic Stripping Voltammetry*) ou ainda voltametria adsortiva de redissolução (AdSV, do inglês *Adsorptive Stripping Voltammetry*). Em qualquer um dos casos, realiza-se a pré-concentração do analito em um potencial constante no eletrodo de trabalho. A eletrólise é feita por um período determinado e sob agitação constante para que, através da convecção, ou seja, das condições hidrodinâmicas, uma maior quantidade de analito possa se deslocar da solução para a camada de difusão, e se deposite na pequena área do eletrodo de trabalho (HARRIS, 2005).

Posteriormente deixa-se a solução em repouso para que o sistema entre em equilíbrio, e faz-se a varredura de potencial desejada (para valores mais positivos ou negativos), onde o analito é redissolvido, retornando à solução, devido sua redução ou oxidação. Ao retornar para a solução inicial, a corrente varia, e o pico de corrente obtido é proporcional à concentração do analito presente na solução (HARRIS, 2005).



## 4.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico, e todas as soluções foram preparadas usando água destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q. O ácido nítrico, ácido sulfúrico, e peróxido de hidrogênio foram fornecidos pela Vetec, Brasil. O surfactante Tween 80 da marca Fluka (UK), estereato de octila utilizado como fase oleosa, da marca Galena (Brasil), resina Amberlite XAD-2 (Sigma Aldrich, Brasil) e o material de referência certificado Whole Egg Powder (SRM 8415) do National Institute of Standards and Technology (NIST, EUA, SpecSol).

Todas as soluções intermediárias dos analitos foram feitas a partir da diluição do padrão certificado do NIST-EUA Specsol  $1\text{ g L}^{-1}$ , de forma a obter as seguintes concentrações: Zn  $100\text{ mg L}^{-1}$ , Cd  $50\text{ mg L}^{-1}$ , Pb  $50\text{ mg L}^{-1}$ , Cu  $20\text{ mg L}^{-1}$ , Se  $10\text{ mg L}^{-1}$ , Mn  $10\text{ mg L}^{-1}$ .

As amostras de ovos utilizadas neste trabalho foram compradas em um mercado da cidade de Santa Maria, RS.

## 4.3 Tratamento das amostras

Neste trabalho as amostras de ovos de galinha receberam três diferentes tipos de pré-tratamento: abertura ácida, digestão por radiação ultravioleta (UV) e a emulsificação.

### 4.3.1 Abertura ácida

Para digestão ácida, feita em conformidade com a EPA3050B, pesou-se cerca de 1 g de amostra de ovo previamente homogeneizado e a seguir adicionou-se 10 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado e 3 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O frasco foi então levado para um bloco digestor, com temperatura

aproximada de 100°C. A amostra permanece no bloco até que todos os vapores nitrosos sejam liberados. Ao final da digestão, transfere-se a amostra digerida para um frasco com capacidade para 50 mL e completa-se o volume com água ultrapura.

#### 4.3.2 Digestão por radiação UV

Para esta abertura pesa-se aproximadamente 0,1 g de amostra (também homogeneizada) em tubo de quartzo, adiciona-se 10 mL de água ultrapura, 100 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A amostra é então levada ao digestor UV, onde fica por aproximadamente três horas à 80°C. Adiciona-se ainda, a cada hora que a amostra permanece no digestor UV, mais 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> às amostras.

#### 4.3.3 Emulsificação das amostras

Para o preparo das emulsões pesar alíquotas da amostra, surfactante e estereato de octila (2%, 4% e 4%, m/v, respectivamente), colocar em béquer com capacidade de 80 mL e adicionar água aquecida (75°C) sob contínua agitação até completar o volume de 50 mL. Após mantém-se agitação por aproximadamente 15 minutos para o arrefecimento. Uma vez pronta a emulsão, uma alíquota de 10 mL da mesma é colocada em contato com 0,5 g da resina Amberlite XAD-2 em um béquer por 15 minutos. Posteriormente, filtra-se esse sistema e, devido à retenção dos analitos pela resina faz-se a dessorção destes com 2 mL de ácido perclórico 10%.

### 4.4 Procedimento analítico

Na célula voltamétrica de quartzo, previamente descontaminada, são pipetados 10 mL de água Milli-Q, 100 µL de amostra e 200 µL de KCl 3 mol L<sup>-1</sup>

(eletrólito suporte). Segue a etapa de desaeração da solução com nitrogênio ultrapuro durante 300 segundos. Posteriormente, a determinação dos analitos é feita na seguinte ordem:

#### 4.4.1 Determinação simultânea de zinco, cádmio, chumbo e cobre

Primeiramente faz-se a determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu por ASV. A etapa de pré-concentração é realizada a um potencial de -1100 mV durante 60 segundos e posteriormente faz-se a varredura de potenciais de -1100 mV à 200 mV, aplicando-se 50 mV de amplitude de pulso. Após as três adições do padrão, os sinais de Zn(II), Cd(II), Pb(II) e Cu(II) podem ser observados próximos à -900 mV, -600 mV, -450 mV e 100 mV, respectivamente (pH da célula 2,65). Finalizada a determinação destes analitos, ajustam-se os parâmetros de medida para determinação sequencial de selênio por CSV.

#### 4.4.2 Determinação sequencial de selênio

A pré-concentração é feita à -450 mV por 120 segundos. Terminada a etapa de pré-concentração do selênio, faz-se uma varredura no sentido catódico de potenciais, de -450 mV à -950 mV, com velocidade igual a  $60 \text{ mV s}^{-1}$ . Ao término das três adições do padrão, o sinal do Se (IV) pode ser observado próximo à -700 mV (pH da célula 2,4).

#### 4.4.3 Determinação sequencial de manganês

Para que se possa fazer a determinação de manganês por ASV, adiciona-se à célula voltamétrica hidróxido de sódio e ácido acético, que são usados como eletrólito suporte e agente de complexação, ajustando para pH=10. Os parâmetros

do equipamento são então ajustados para fazer por 200 s a pré-concentração do manganês à -1700 mV. Após esse tempo de pré-concentração é feita a varredura de -1700 mV à -1200 mV por ASV, onde observa-se o pico do Mn (II) próximo à -1450 mV.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Pré-tratamento das amostras

Pré-tratar amostras significa convertê-las, através de diferentes procedimentos, em uma forma que seja possível fazer a determinação e quantificação de seus analitos.

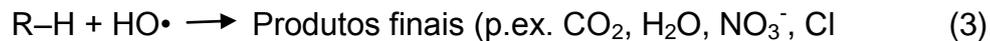
Informações sobre a correta concentração de diferentes elementos em amostras de alimentos é essencial do ponto de vista nutricional, tecnológico e toxicológico. Nesta perspectiva, a integridade da informação química é fortemente dependente das etapas prévias de análise, assim a adequada preparação da amostra torna-se de fundamental importância (KORN et al, 2008).

Diferentes procedimentos de preparação de amostra têm sido aplicados para a determinação de diversos elementos em diversas matrizes com o intuito de minimizar o manuseio da amostra e o consumo de reagentes. Desta forma, busca-se reduzir a contaminação da amostra e melhorar o rendimento analítico (KORN et al, 2008; DE CARVALHO et al, 2008).

Nas análises voltamétricas a amostra deve estar livre da presença de matéria orgânica, uma vez que esta pode comprometer a determinação da concentração real dos analitos, devido à formação de complexos estáveis inertes à detecção. A matéria orgânica pode também competir com as espécies de interesse pela superfície do eletrodo de trabalho, reduzindo consideravelmente a sensibilidade da medida e provocando o aparecimento de sinais de fundo (DE CARVALHO et al, 2008; CAVICCHIOLI & GUTZ, 2003).

O método clássico para a destruição da matéria orgânica dissolvida é a mineralização por via úmida, que emprega o aquecimento da amostra e adição de reagentes como ácidos oxidantes e peróxido de hidrogênio. Este método apresenta a grande desvantagem de oferecer um alto risco de contaminação das amostras, além de exigir um grande volume de reagentes e um longo tempo de mineralização (DE CARVALHO et al, 2008).

Uma alternativa à mineralização ácida é a mineralização empregando irradiação UV que, além de ser eficiente, minimiza a possibilidade de contaminação da amostra devido ao uso de pequenas quantidades de ácidos e peróxido de hidrogênio. A fotólise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da H<sub>2</sub>O pela radiação UV gera os radicais hidroxila (HO•) conforme pode ser observado nas reações (1) e (2) a seguir. Estes radicais agem oxidando os compostos orgânicos da amostra, formando compostos mais simples como produtos finais de degradação (reação 3), e provocando a liberação dos analitos para a solução (DE CARVALHO et al, 2008). Por esta razão a utilização da digestão UV tem sido bastante empregada no tratamento de amostras (MANJUSHA et al, 2007; DE CARVALHO et al, 2008; CAVICCHIOLI & GUTZ, 2003; DE CARVALHO et al, 1999).



A adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta a eficiência de mineralização das amostras por radiação UV, devido à formação de radicais HO• em maior concentração e sua subsequente reação de degradação com a matéria orgânica (reação 3). Aliado a isso, a acidificação de amostras contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também é importante que provoca a dissociação dos complexos orgânicos lábeis formados com metais. Então, a fim de aumentar e acelerar a mineralização das amostras, utilizA-se ácido e peróxido em conjunto (DE CARVALHO *et al*, 2008).

O radical hidroxila pode reagir através de três mecanismos distintos: abstração de hidrogênio, transferência de elétrons e adição radicalar. Os radicais secundários formados durante estas reações podem novamente reagir com outros compostos (DE CARVALHO et al, 2008).

A amostra fica por 3 horas no digestor UV, pois em tempos menores de radiação a mineralização da amostra está incompleta, sendo este fato percebido pela presença de material particulado nos tubos das amostras irradiadas.

Embora a digestão com radiação UV seja eficiente, deve-se cuidar para que não haja o superaquecimento da amostra, e para isso existe a necessidade de um

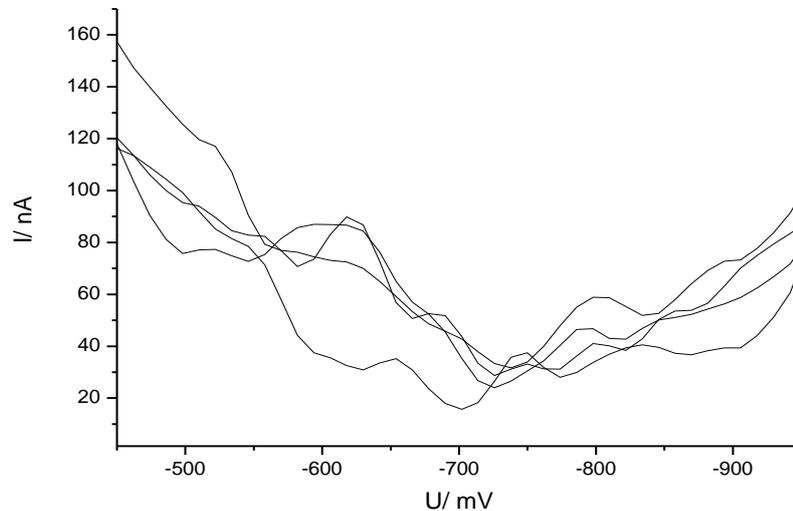
bom sistema de resfriamento adaptado ao sistema de irradiação, a fim de evitar a perda da amostra e, conseqüentemente, de analitos por evaporação.

Porém, quando se visa à determinação eletroanalítica, o que importa não é, necessariamente, a completa mineralização dos compostos orgânicos, mas sim a perda da capacidade complexante perante os íons metálicos ou, pelo menos, a formação de adutos lábeis (CAVICCHIOLI & GUTZ, 2003).

O emulsionamento de amostras para análises posteriores vem ganhando cada vez mais espaço como uma forma mais rápida e menos dispendiosa de tratamento de amostras (IEGGLI et al, 2010; MINE, 1998; BURGUERA & BURGUERA, 2012). O emulsionamento das amostras de ovos neste trabalho tornou-se uma alternativa interessante, uma vez que assim não seria necessário destruir a matéria orgânica presente na mesma ou usar grandes quantidades de reagentes. A idéia de emulsionar as amostras de ovos surgiu da impossibilidade de analisar diretamente esta matriz por voltametria, já que a mesma devido ao elevado teor lipídico, não se solubilizava no conteúdo da célula voltamétrica. Ao emulsionar a amostra, o sistema obtido apresenta comportamento similar ao de solução aquosa, pois o óleo fica disperso na água. A emulsão é um sistema de duas fases (óleo/água) onde uma das fases está dispersa na forma de gotas na outra. Com a emulsificação direta da amostra ocorre a estabilização do conteúdo oleoso presente (IEGGLI et al, 2010; PAUL & MOULIK, 2001; MANIASSO, 2001).

Para a emulsificação das amostras de ovos utilizou-se o tensoativo Tween 80 e o estereato de octila. Os tensoativos, também chamados de surfactantes, contém grupamentos hidrofílicos e lipofílicos com duas funções bem importantes: diminuir a tensão superficial entre o óleo e a água e a formação de um filme ao redor das gotículas, estabilizando a fase dispersa. Já o estereato de octila é utilizado como componente oleoso adicional que atua melhorando a estabilidade da emulsão (IEGGLI et al, 2010).

Uma vez alcançado o comportamento de solução aquosa com a formação da emulsão, resolvemos convenientemente o problema gerado pelo seu elevado teor de gordura, obtendo-se uniformidade na célula voltamétrica. Todavia, o material orgânico ainda presente era um tanto inconveniente para realizar a medida. Isto pode ser observado no voltamograma ilustrado na Figura 1, onde nota-se a elevação da linha base que prejudicou fortemente a sensibilidade e comprometeu a reprodutibilidade das medidas.



**Figura 1** - Voltamograma obtido na determinação de selênio. Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q, 50  $\mu\text{L}$  de amostra emulsionada de ovo de galinha, 0,05M de eletrólito suporte (KCl), adições crescentes (10,20,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) do padrão de Se(IV).

Procurou-se então uma forma de amenizar o elevado conteúdo de matéria orgânica oriundo da amostra, de forma a possibilitar a análise voltamétrica. Ao fazer um estudo bibliográfico, descobriu-se que o uso de resinas capazes de adsorver a matéria orgânica de amostras tem sido estudado (JANOS, 2003; GRABARCZYK, 2008; LEPANE, 1999).

Grabarczyk e Korolczuk, em 2010 tentaram eliminar as interferências orgânicas usando Amberlite XAD-7, com o objetivo de desenvolver um método rápido e simples de tratamento de amostras de águas para posterior análise voltamétrica. Esta resina demonstrou ser promissora uma vez que eliminou as interferências sem que as amostras precisassem de qualquer outro tipo de tratamento. O Amberlite XAD-7 foi adicionado diretamente na célula voltamétrica, e a adsorção dos compostos orgânicos ocorriam simultaneamente ao processo de desaeração.

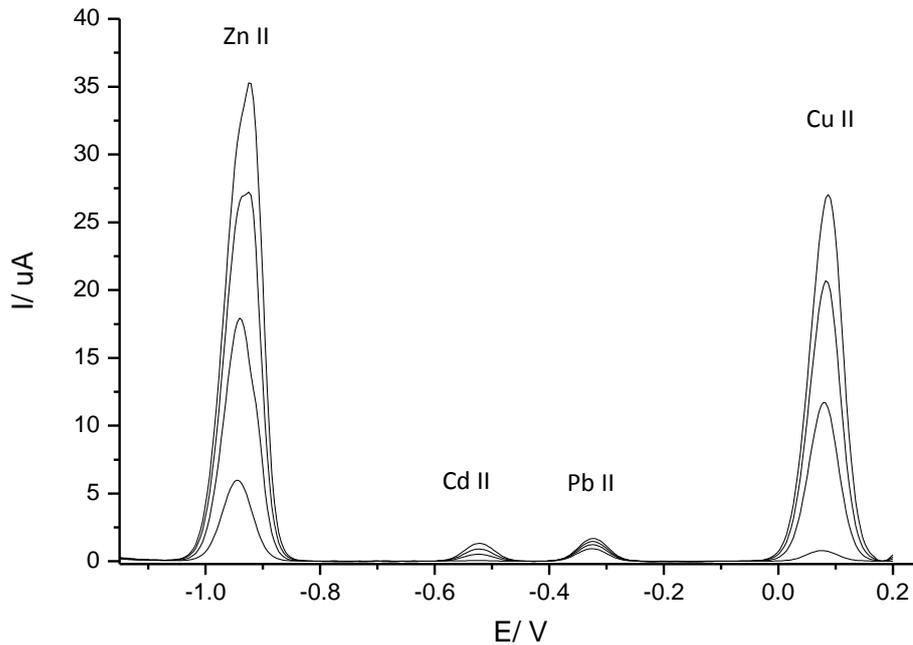
A emulsão feita foi então colocada na célula juntamente com a resina Amberlite XAD-2 e os demais componentes da célula (água e eletrólito). O problema foi parcialmente resolvido, pois houve a estabilização da linha base, porém não se

obteve sinal para nenhum dos analitos, mesmo após as adições dos padrões. Ficou evidente que a resina estava adsorvendo não somente a matéria orgânica, mas também os analitos. Este inconveniente foi bem resolvido quando a emulsão foi deixada em contato por 15 minutos com a resina XAD-2 para posteriormente ocorrer a dessorção dos analitos retidos pela resina com ácido perclórico 10%. Assim, após a dessorção com o ácido, 100  $\mu\text{L}$  do filtrado obtido é adicionado à célula voltamétrica, livre de qualquer interferência.

## 5.2 Análise por voltametria

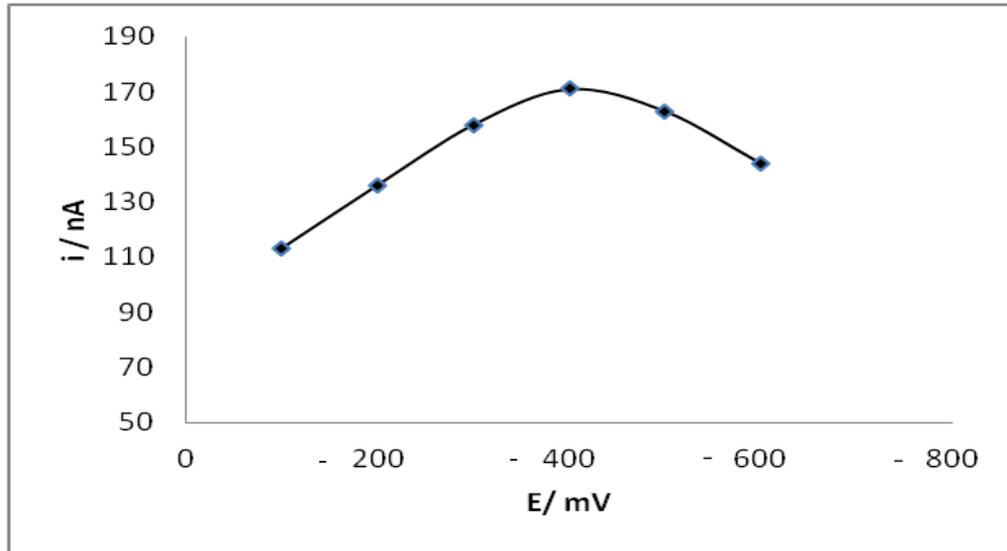
Foram realizadas investigações experimentais sobre os potenciais de pré-concentração ( $E_d$ ), tempos de pré-concentração ( $t_d$ ), potencial de amplitude de pulso ( $E_{amp}$ ) e velocidade de varredura ( $v$ ), de modo a encontrar as condições ótimas de determinação dos seis analitos estudados. A otimização de tais parâmetros é muito importante para a realização de medidas sensíveis e reproduzíveis.

Para encontrar o melhor potencial de pré-concentração na determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu, o mesmo foi variado de -1400mV à -1000mV, obtendo-se como potencial ótimo de deposição -1100mV. O tempo de pré-concentração foi variado de 30 a 120 segundos, e não havendo ganho significativo de sinal dos analitos após 60s, sendo este o tempo escolhido. As variações na taxa de varredura (20, 40 e 60  $\text{mV s}^{-1}$ ) e amplitude de pulso (25 a 100 mV) não modificaram significativamente os valores de corrente dos analitos, escolhendo-se então 60  $\text{mV s}^{-1}$  e 50 mV para velocidade de varredura e amplitude de pulso, respectivamente. Voltamograma típico desta determinação simultânea é mostrado na Figura 2 a seguir.

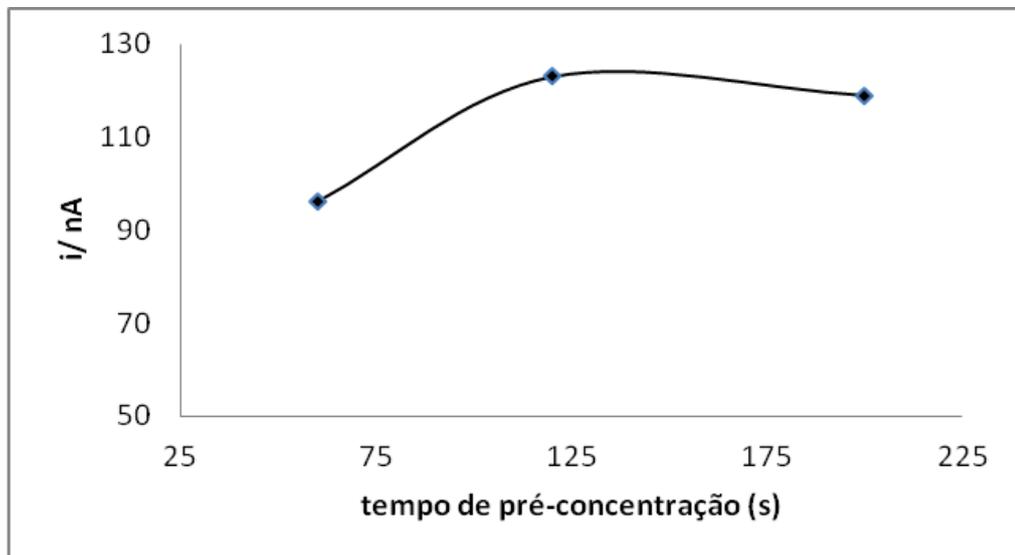


**Figura 2** - Voltamograma de redissolução anódica obtido na análise simultânea para concentrações crescentes ( $10, 20, 30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de Zn(II), Cd(II), Pb(II) e Cu(II) usando eletrodo de mercúrio (modo HMDE). Potencial de deposição =  $-1100 \text{ mV}$ , tempo de deposição =  $60 \text{ s}$ .

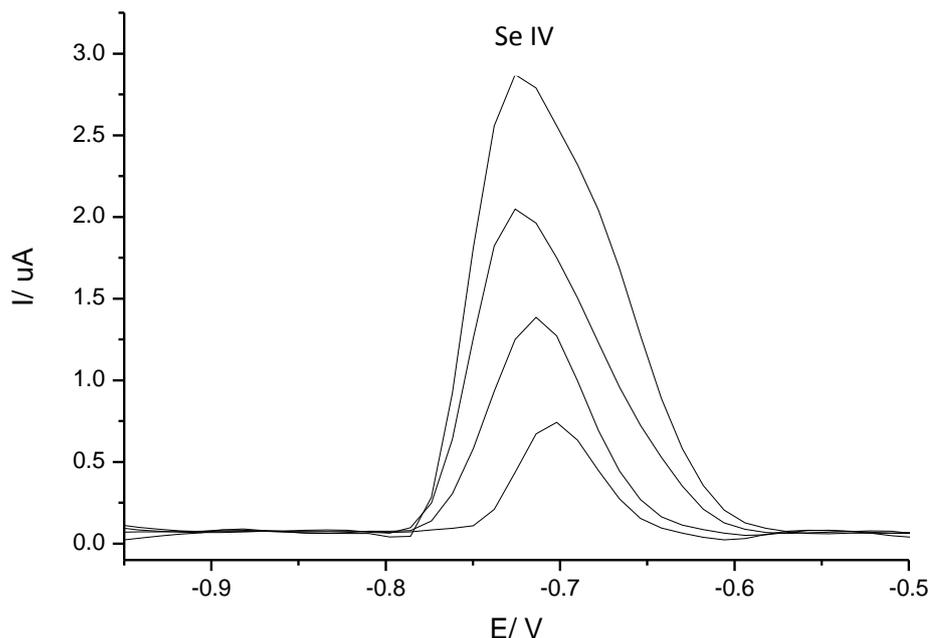
Na determinação seqüencial de selênio, o potencial de pré-concentração foi variado de  $-600 \text{ mV}$  à  $-100 \text{ mV}$ , obtendo-se maior valor de corrente em  $-450 \text{ mV}$  (Figura 3). O tempo de deposição foi variado de  $60$  a  $200 \text{ s}$ , sendo o tempo ótimo  $120 \text{ s}$  (Figura 4). Os parâmetros velocidade de varredura e amplitude de pulso, por não terem levado a variações significativas de corrente, foram mantidos iguais aos da determinação simultânea ocorrida no passo anterior. Voltamograma típico é mostrado na Figura 5.



**Figura 3** - Efeito do potencial de pré-concentração na corrente de pico para  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Se(IV). Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Se(IV),  $1 \text{mg L}^{-1}$  de Cu(II).



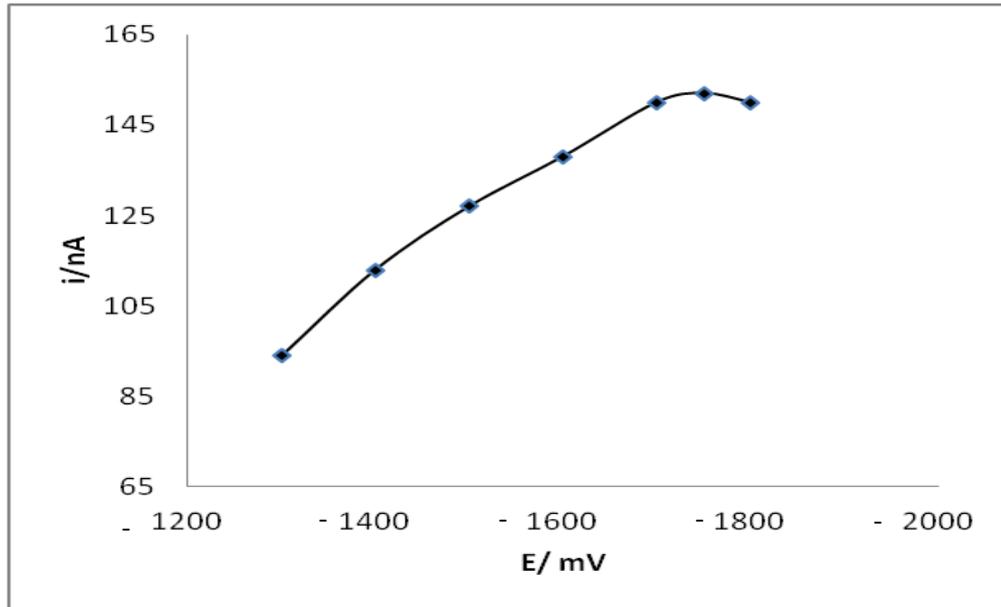
**Figura 4** - Efeito do tempo de pré-concentração na corrente de pico para  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Se(IV). Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Se(IV),  $1 \text{mg L}^{-1}$  de Cu(II).



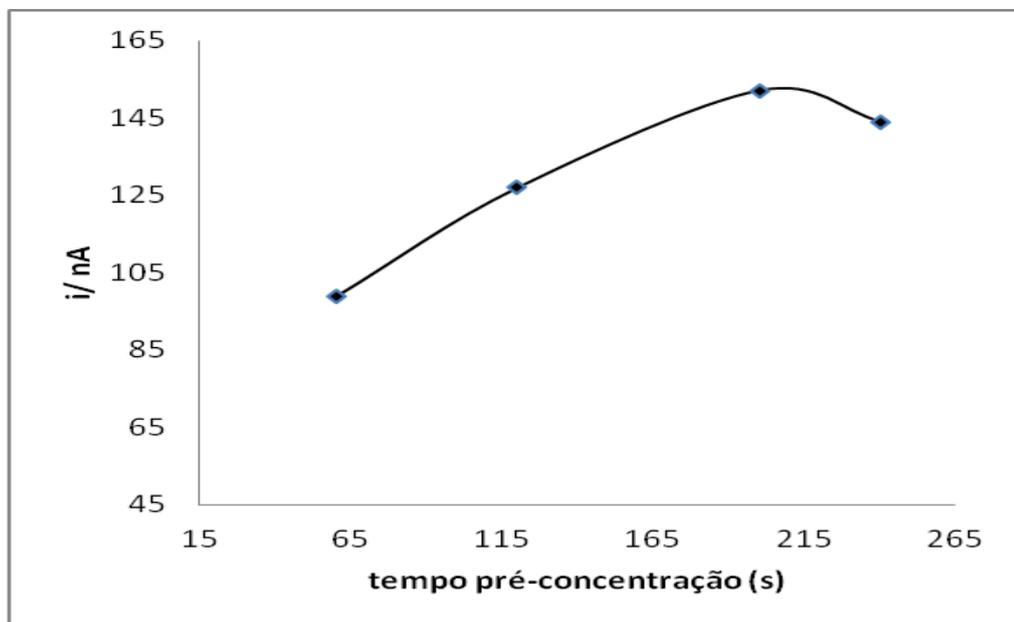
**Figura 5** - Voltamograma de redissolução catódica obtido sequencialmente, para concentrações crescentes (10, 20 e 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Se(IV). Potencial de deposição = -450 mV, tempo de deposição = 120s.

O deslocamento observado no voltamograma de determinação do selênio, na Figura 5, deve-se ao conteúdo de cloreto presente no meio, oriundo do eletrólito suporte. Em meios contendo íons cloreto, pode-se esperar um deslocamento catódico do potencial de redução do analito, uma vez que pode haver a formação de cloro-complexos que competem com o analito pela superfície do eletrodo de mercúrio. Desta forma é necessário empregar um potencial mais negativo para que o analito consiga se reduzir na superfície do eletrodo.

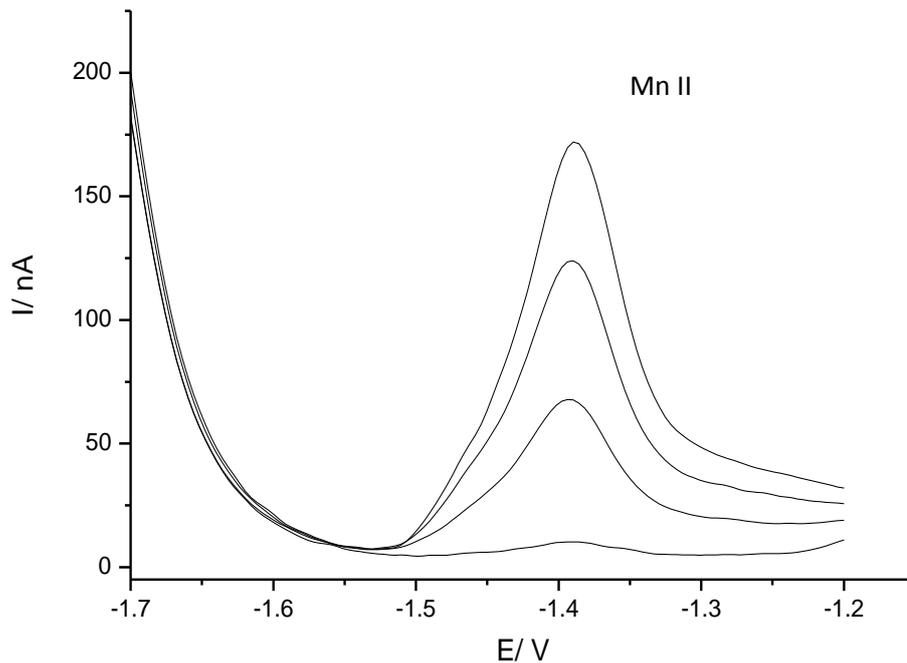
A determinação seqüencial de manganês contou com uma variação de potenciais de pré-concentração de -1200 à -1700 mV, sendo este último o potencial responsável pelo maior valor de corrente obtido (Figura 6). O tempo de pré-concentração variou de 60 a 250s e como não houve aumento considerável de sinal após 200s, escolheu-se este tempo de deposição como ótimo (Figura 7). Mantiveram-se os valores de velocidade de varredura e amplitude de pulso. Voltamograma típico é mostrado na Figura 8.



**Figura 6** - Efeito do potencial de pré-concentração na corrente de pico do Mn(II). Solução de medida: 10mL de água Milli-Q,  $10\mu\text{g L}^{-1}$  de Mn(II), 0,05M de ácido acético/hidróxido de amônio (pH 10).



**Figura 7** - Efeito do tempo de pré-concentração na corrente de pico do Mn(II). Potencial de deposição = -1700 mV. Solução de medida: 10 mL de água Milli-Q,  $10\mu\text{g L}^{-1}$  de Mn(II), 0,05M de ácido acético/hidróxido de amônio (pH 10).



**Figura 8** - Voltamograma de redissolução anódica obtido de forma sequencial, para concentrações crescentes ( $10, 20, 30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de Mn(II). Potencial de deposição =  $-1700 \text{ mV}$ , tempo de deposição =  $200 \text{ s}$ ,  $0,05\text{M}$  de ácido acético/hidróxido de amônio (pH 10) como eletrólito suporte e agente de complexação.

Após avaliar todos os parâmetros, chegou-se às condições ótimas do método, que encontram-se resumidas na Tabela 2 abaixo.

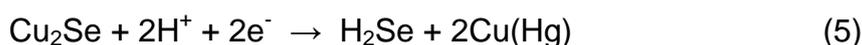
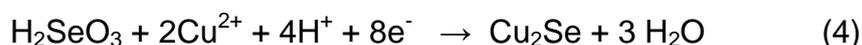
**Tabela 2** - Condições voltamétricas otimizadas para a determinação de cádmio, chumbo, cobre, manganês, selênio e zinco.

Parâmetros	Zn/Cd/Pb/Cu	Se	Mn
$E_d$ (mV)	-1100	-450	-1700
$t_d$ (s)	60	120	200
$E_{amp}$ (mV)	50	50	50
$V$ ( $\text{mV s}^{-1}$ )	60	60	60
$E_i$ (mV)	-1100	-450	-1700
$E_f$ (mV)	200	-950	-1200

A determinação simultânea de zinco, cádmio, chumbo e cobre por voltametria é bem descrita na literatura (LOCATELLI, 2003; DE CARVALHO et al, 2008; LOCATELLI & TORSI, 2003; PINTO & LEMOS, 2013; LOCATELLI & TORSI, 2000; STADEN & MATOETOE, 2000). É um método clássico e um dos mais difundidos na voltametria. A determinação por ASV é realizada com HMDE (eletrodo de gota de mercúrio pendente) e DPASV (voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial) como modo de pulso e varredura de potenciais. Os sinais dos analitos são bem definidos e não há interferência mútua. É importante ressaltar que o cobre oriundo da amostra e das adições do padrão é fundamental para a posterior determinação de selênio.

O método convencional de determinação de selênio consiste no acúmulo de HgSe no eletrodo de trabalho de mercúrio, em meio ácido. O pico obtido durante a varredura pode ser atribuído a espécies de Se(IV) pouco solúveis formadas com íons mercúrio na superfície do eletrodo, como HgSeO<sub>3</sub> ou Hg<sub>3</sub>(HSeO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (ZUMAN & SOMER, 2000). Porém, em amostras com altas concentrações de cloretos, pode ocorrer a formação de calomelano, sendo este responsável pela conversão do Se(IV) a Se(VI) ou Se(0) e pela oxidação do Hg(I) a Hg(II) (DO NASCIMENTO et al, 2009; DE CARVALHO et al, 1999).

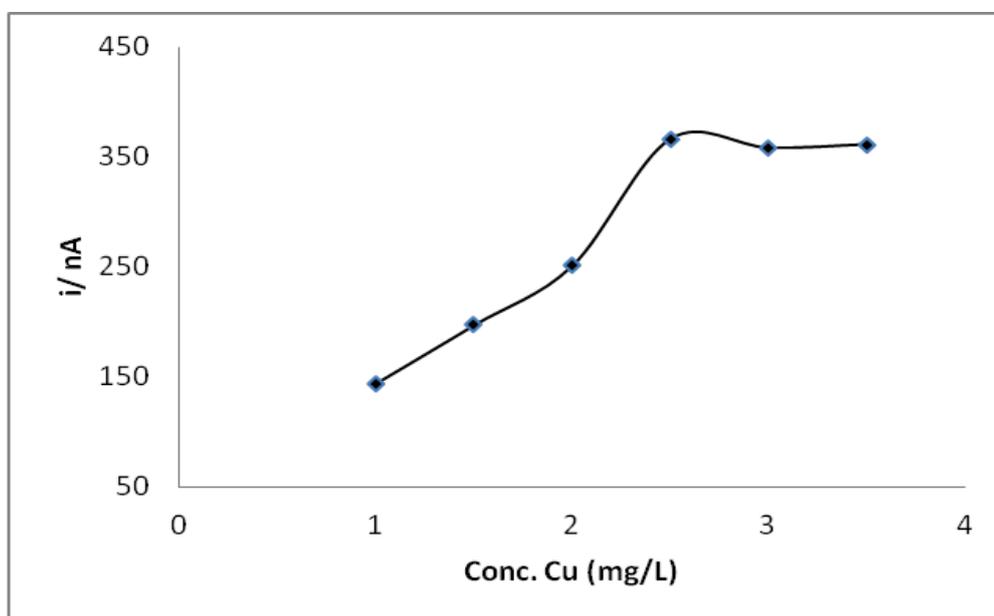
Por esta razão os íons cobre desempenham importante papel na determinação do selênio. Os íons cobre atuam como agentes co-depositores que facilitam a solubilização do analito no mercúrio, através da formação do seleneto de cobre (Cu<sub>2</sub>Se), conforme mostram as reações abaixo (DO NASCIMENTO et al, 2009; DE CARVALHO et al, 1999).



O sinal voltamétrico obtido pelo acúmulo de espécies de Cu<sub>2</sub>Se no HMDE implica em limites de detecções mais adequados, aumento da faixa linear e menos interferências que o gerado pelo método convencional. O método CSV aliado à co-eletrolise de Se(IV) com Cu(II) mostra-se, portanto, uma alternativa bastante interessante, pois além de reduzir as interferências de íons metálicos (devido à

formação de selenetos estáveis), aumenta a sensibilidade do método (DO NASCIMENTO et al, 2009).

A determinação de selênio não foi possível sem a presença de cobre na célula voltamétrica, o que confirma a realização da co-eletródese de deposição nas medidas realizadas. A Figura 9 mostra a relação entre a concentração de cobre presente na célula e a corrente obtida para o selênio. Concentrações de Cu(II) acima de  $2,5\text{mgL}^{-1}$  não provocaram aumento na corrente de pico do Se(IV), estando este em concentração igual a  $20\mu\text{gL}^{-1}$  na célula.



**Figura 9** - Efeito da concentração de Cu(II) na corrente de pico para  $20\mu\text{gL}^{-1}$  Se(IV)

A determinação de manganês por voltametria, em diferentes condições, é bem descrita na literatura, embora a medida seja dificultada pela baixa solubilidade do mesmo no mercúrio, pela liberação do hidrogênio e a formação de compostos intermetálicos (ZHANG & DI, 2003; LOCATELLI, 1996; PIECH et al, 2008). Por estas razões é relatado o uso de diferentes tampões, que tem a finalidade de tornar o meio básico, já que o potencial de redução do manganês é bastante negativo, de forma a ampliar um pouco a faixa de trabalho do eletrodo sem que haja a evolução do hidrogênio. A literatura também relata a adição de algumas soluções à célula voltamétrica, com a função de eletrólito suporte e agente de complexação, de forma

a facilitar a solubilidade do Mn e, portanto, sua determinação (OHURA et al, 2003; EL-MAALI & EL-HADY, 1998; LOCATELLI, 2004; BRULAND & ROITZ, 1996; PIECH et al, 2008).

Neste trabalho, a determinação do manganês é feita através da formação do complexo manganês-acetato de amônio, que facilita a solubilização do analito, proporcionando melhor sensibilidade à medida. Medidas sem a adição de acetato de amônio levam a considerável diminuição do sinal do manganês. A concentração ótima do ligante foi encontrada como sendo 0,05M de ácido acético e 0,15M de hidróxido de amônio (pH 10) (EL-MAALI & EL-HADY, 1998).

### **5.3 Parâmetros de validação**

Concluída a etapa de otimização das condições para a determinação de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês, procedeu-se os estudos com algumas figuras de mérito. Neste trabalho os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: limites de detecção e quantificação (LD e LQ), recuperação e faixa linear.

A exatidão do método foi avaliada através da análise do material de referência certificado (SRM 8415 – Whole Egg Powder), e do comparativo com o método de absorção atômica, tido como referência. As recuperações obtidas com esta amostra certificada são apresentadas nas tabelas 3, 4 e 5 a seguir, de acordo com o tipo de pré-tratamento recebido pela amostra. Ressalta-se que a amostra certificada, por caracterizar-se como um pó seco, não forma emulsão e sim suspensão. Apesar da diferente classificação, o preparo dessa suspensão foi o mesmo recebido pelas amostras emulsionadas. Diferentemente das emulsões, a suspensão com o material de referencia certificado apresentou menor estabilidade, precipitando após 24h, provavelmente devido ao conteúdo sólido não estabilizado pelas micelas. Todavia, a homogeneidade do sistema era restaurada com a agitação do sistema.

**Tabela 3** - Recuperações obtidas para amostra certificada (SRM 8415 – Whole Egg Powder) após digestão ácida.

<b>Elemento</b>	<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor encontrado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Zn</b>	67,5	65,393	96,88
<b>Cd</b>	0,005	0,004	89,12
<b>Pb</b>	0,061	0,050	82,94
<b>Cu</b>	2,70	2,261	84
<b>Se</b>	1,39	1,162	83,45
<b>Mn</b>	1,78	1,581	88,76

**Tabela 4** - Recuperações obtidas para amostra certificada (SRM 8415 – Whole Egg Powder) após digestão UV.

<b>Elemento</b>	<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor encontrado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Zn</b>	67,5	71,552	105,99
<b>Cd</b>	0,005	0,004	91,8
<b>Pb</b>	0,061	0,054	90
<b>Cu</b>	2,70	2,971	110
<b>Se</b>	1,39	1,275	91,36
<b>Mn</b>	1,78	1,692	95,27

**Tabela 5** - Recuperações obtidas para amostra certificada (SRM 8415 – Whole Egg Powder) que recebeu tratamento emulsionado.

<b>Elemento</b>	<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor encontrado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Zn</b>	67,5	69,155	102,44
<b>Cd</b>	0,005	0,004	84
<b>Pb</b>	0,061	0,053	86,56
<b>Cu</b>	2,70	2,628	97,04
<b>Se</b>	1,39	1,211	87,05
<b>Mn</b>	1,78	1,620	91,01

Observando as tabelas acima, verifica-se que a convencional abertura ácida foi responsável pelos menores valores de recuperação obtidos, embora ainda dentro do limite considerado aceitável. Isto já era esperado, devido às drásticas condições da abertura, que envolve grande volume de ácido concentrado e altas temperaturas, contribuindo com a contaminação da amostra e perda dos analitos. Já a radiação UV recebida pela amostra proporcionou os melhores resultados de recuperação, demonstrando assim ser a forma mais eficiente de tratamento da amostra. Isto porque a pequena quantidade de reagentes e temperatura não tão alta contribuem para diminuir tanto a contaminação quanto as perdas. A suspensão do material de referencia proporcionou resultados intermediários de recuperação, demonstrando ser uma alternativa viável no preparo de amostras com alto teor lipídico.

Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados de acordo com as equações:  $LD = 3s/m$  e  $LQ = 10s/m$ , onde  $s$  se refere aos desvios-padrão da curva de calibração de cada analito, e  $m$  refere-se à inclinação das respectivas curvas (MILLER; MILLER, 1994). Os resultados encontrados para LD e LQ juntamente com a faixa linear de cada um dos analitos estão expostos na Tabela 6 abaixo:

**Tabela 6** - Valores encontrados para os limites de detecção, quantificação e faixa linear

Elemento	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Zn	0,15	0,26	1,0 – 730
Cd	0,27	0,91	0,3 – 580
Pb	0,26	0,38	0,6 – 510
Cu	0,21	0,70	1,0 – 670
Se	0,35	0,68	1,0 – 110
Mn	0,33	0,45	1,0 – 80

As características de um método analítico são definidas pelas figuras de mérito, estas obtidas experimentalmente. Neste trabalho ao avaliarmos a linearidade, a sensibilidade e a exatidão do método desenvolvido, percebemos que o

mesmo apresenta características satisfatórias, respondendo adequadamente ao propósito.

#### **5.4 Aplicação do método em amostras**

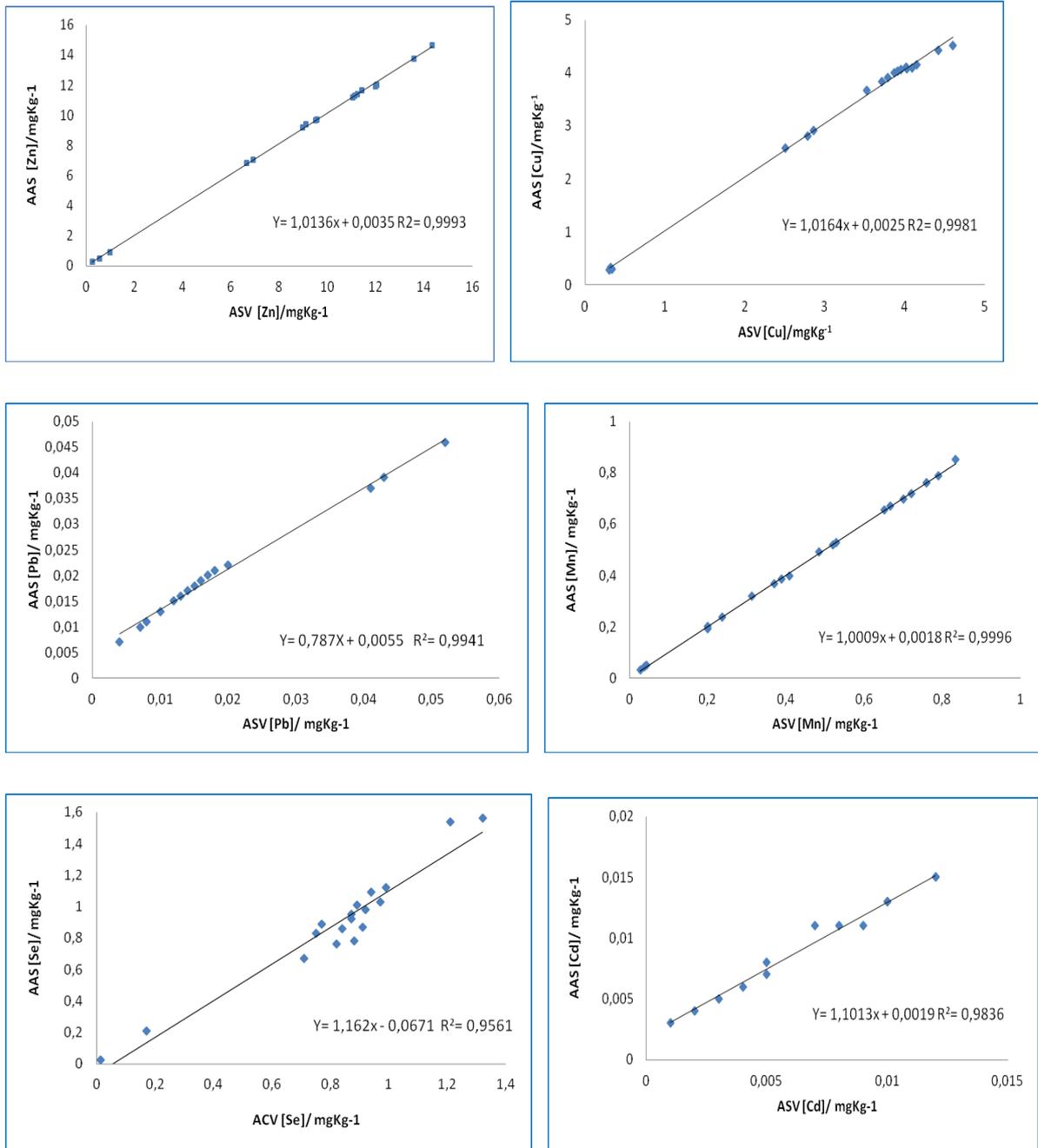
Após otimizar as condições do método e verificar que o mesmo possui bom desempenho analítico, aplicou-se o mesmo em amostra de ovos de galinha. Este método eletroquímico foi desenvolvido buscando ser uma alternativa à técnica de absorção atômica, atualmente empregada nas análises da matriz em questão. Isto deve-se ao fato de a voltametria apresentar vantagens frente à AAS, como análise simultânea dos elementos com conseqüente redução do tempo de análise, além do menor custo da mesma. Por esta razão, após as determinações de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês nas amostras de ovos de galinha através do método proposto, realizaram-se medidas comparativas em um espectrômetro de absorção atômica. Desta forma foi possível obter gráficos de ensaios de regressão (Figura 10) para cada um dos analitos estudados, onde se pode verificar a correlação entre os dois métodos, sendo esta a segunda etapa da avaliação da exatidão. A Tabela 7 a seguir mostra os resultados obtidos para as seis amostras analisadas por voltametria e espectroscopia de absorção atômica, respectivamente.

**Tabela 7** - Concentrações médias ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês, encontradas nas seis amostras de ovos de galinha analisadas por voltametria e absorção atômica

Elemento	Tratamento	Concentração $X \pm S.D., \text{mgkg}^{-1}$ Voltametria	Concentração $X \pm S.D., \text{mgkg}^{-1}$ AAS	Elemento	Tratamento	Concentração $X \pm S.D., \text{mgkg}^{-1}$ Voltametria	Concentração $X \pm S.D., \text{mgkg}^{-1}$ AAS
Zn	UV	$10,78 \pm 1.4$	$10,68 \pm 0.9$	Cu	UV	$3,87 \pm 0.02$	$3,79 \pm 0.1$
	Ácida	$10,57 \pm 0.8$	$10,46 \pm 0.6$		Ácida	$3,83 \pm 0.03$	$3,83 \pm 0.6$
	Emulsionado	$10,26 \pm 1.2$	$10,08 \pm 1.0$		Emulsionado	$3,66 \pm 0.08$	$3,58 \pm 0.4$
Cd	UV	$0,0063 \pm 0.03$	$0,0068 \pm 1.0$	Se	UV	$1,25 \pm 0.03$	$1,04 \pm 0.05$
	Ácida	$0,0086 \pm 0.03$	$0,0074 \pm 0.7$		Ácida	$0,88 \pm 1.2$	$0,84 \pm 0.3$
	Emulsionado	$0,0074 \pm 0.04$	$0,0052 \pm 0.9$		Emulsionado	$0,786 \pm 0.5$	$0,91 \pm 0.1$
Pb	UV	$0,021 \pm 0.2$	$0,0178 \pm 0.4$	Mn	UV	$0,534 \pm 0.3$	$0,53 \pm 0.04$
	Ácida	$0,022 \pm 0.3$	$0,0195 \pm 0.2$		Ácida	$0,569 \pm 0.9$	$0,57 \pm 0.3$
	Emulsionado	$0,017 \pm 0.7$	$0,0168 \pm 0.5$		Emulsionado	$0,488 \pm 0.2$	$0,48 \pm 0.02$

Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

Conforme mencionado anteriormente, após as análises por voltametria e absorção atômica, fez-se os gráficos de regressão, de forma a possibilitar a comparação entre os métodos. Os gráficos obtidos estão expostos na Figura 10 abaixo.



**Figura 10** - Gráficos de ensaios de regressão obtidos através das concentrações de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês nas amostras de ovos de galinha por voltametria e AAS.

A partir dos gráficos de regressão mostrados na Figura 10, verificou-se que os métodos são compatíveis e que, portanto, o método voltamétrico desenvolvido pode ser usado na determinação dos analitos na matriz em estudo, como uma alternativa ao método tradicional de AAS. Isto deve-se ao fato de os coeficientes angulares das retas obtidas ficarem muito próximos a um, e o ângulo das mesmas retas muito próximos a  $45^\circ$ , o que nos permite concluir que os métodos são equivalentes.

Uma maior dispersão dos pontos foi observada no ensaio de regressão do selênio. Isto deve-se, provavelmente, ao fato de que a análise das amostras por AAS fornece como resultado a concentração total de selênio, já por voltametria, apenas as espécies de Se IV são eletroativas. Desta forma, dependendo do tratamento que a amostra recebe, como no caso da emulsão, a voltametria fornece uma menor concentração de selênio quando comparada à AAS. Justifica-se assim a dispersão notada no gráfico.

Os resultados mostraram a presença dos analitos nas amostras, sendo os nutrientes majoritários zinco e cobre, e em menores concentrações selênio e manganês. Também pode-se observar a presença dos dois contaminantes estudados, cádmio e chumbo, mesmo em baixas concentrações. Resultados semelhantes foram encontrados por Nardi et al, 2009; Giannenas et al, 2009; leggli et al, 2009 e leggli et al, 2010, para os analitos de estudo.

Entre os dois contaminantes estudados neste trabalho, a legislação brasileira determina para ovos e produtos de ovos apenas o Limite Máximo de Resíduos (LMR) para o Pb ( $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Com base nos valores de LMR que a legislação permite a outras matrizes alimentares como carnes, incluindo carnes de frango ( $0,10 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Pb e  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd), e grãos ( $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb e Cd), o método desenvolvido seria adequado para a determinação de Cd e Pb em ovos de galinha, pois apresenta LD abaixo dos limites estipulados pela legislação brasileira para essas outras matrizes (BRASIL).

Ressalta-se que o objetivo do trabalho não foi realizar uma investigação sistemática de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês em uma grande quantidade de amostras, mas sim oferecer uma metodologia alternativa para tais determinações.

## 5.5 Análise de especiação

A análise de especiação consiste na identificação e quantificação de diferentes espécies, que juntas correspondem a concentração total de um elemento.

Estudos a cerca da especiação de selênio têm buscado entender o papel que suas formas desempenham no meio-ambiente e saúde humana (DE CARVALHO et al, 1999; FERRI & FAVERO, 2007; DO NASCIMENTO et al, 2009). Uma vez que apenas o Se IV é eletroativo, e geralmente o selênio é encontrado como Se IV (selenito) e Se VI (selenato), faz-se necessário um método que converta o selenato à selenito anteriormente a análise voltamétrica. A redução do Se VI a Se IV através da irradiação UV, tem sido empregada com eficiência (DO NASCIMENTO et al, 2009). Desta forma, a irradiação UV neste trabalho não só removeu a matéria orgânica das amostras como também propiciou a especiação de selênio nas mesmas, já que as espécies deste elemento ligadas à matéria orgânica são convertidas a Se IV.

A etapa de pré-tratamento da amostra com irradiação UV associada à medida voltamétrica, possibilitou a especiação de selênio. Para isto, fez-se a análise da fração dita lábil (obtida pela medida voltamétrica direta, onde apenas determinamos o Se IV presente na amostra), da concentração total (obtida pela medida voltamétrica após a irradiação UV, ou seja, depois de converter selenato a selenito), e da fração particulada do elemento na amostra (obtida pela diferença entre as outras duas).

A redução fotolítica de selênio pode ser induzida pela absorção de comprimentos de onda abaixo de 230nm ou pela ação de radicais contendo carbono, gerados pela degradação da matéria orgânica presente, com propriedades redutoras (DO NASCIMENTO et al, 2009).

Após as determinações voltamétricas de selênio na amostra emulsionada (e, portanto, a determinação de Se IV presente na amostra) e na amostra irradiada com UV (e, portanto, a determinação da concentração total de selênio como Se IV) conseguiu-se obter por diferença a concentração de Se VI presente nas amostras. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Concentrações de Se IV e Se VI encontradas nas amostras após análise de especiação.

	<b>Se IV emulsão (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Se IV (total) por digestão UV (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Se VI (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Amostra 1</b>	0,932	1,562	0,63
<b>Amostra 2</b>	0,981	1,741	0,76
<b>Amostra 3</b>	0,673	1,036	0,363
<b>Amostra 4</b>	0,867	1,124	0,257
<b>Amostra 5</b>	0,784	1,091	0,307
<b>Amostra 6</b>	0,479	0,953	0,474

Os resultados obtidos na análise de especiação nos permitem observar que não há o predomínio de uma espécie em relação à outra, existem ambas as formas de selênio nas amostras de ovos analisadas. Isto está de acordo com a literatura, que nos informa que as aves poedeiras aqui no Brasil recebem predominantemente suplementação alimentar através da adição de minerais inorgânicos à ração. As formas de selênio apresentadas às aves são, geralmente, selenito e selenato de sódio, o que justifica a presença das duas formas encontradas nas amostras.

## 5.6 Análise crítica dos tratamentos empregados

Ao avaliar as três formas de pré-tratamento empregadas, percebemos que todas são satisfatórias, uma vez que permitiram a análise da matriz por voltametria. A escolha de um tratamento em detrimento de outro deve basear-se nos materiais e tempo disponível para a realização da análise. A digestão ácida, tratamento clássico, embora utilize grandes volumes de reagentes oxidantes que podem contaminar a amostra ou causar perdas de analitos devido às temperaturas elevadas, embora demorada, é sem dúvida uma maneira muito simples e barata de tratar a amostra.

A digestão de UV, por outro lado, surge como uma alternativa um pouco mais dispendiosa, uma vez que requer um digestor UV equipado com lâmpada de

mercúrio de alta pressão e tubos de quartzo. No entanto, além de reduzir o tempo gasto nesta fase de preparação da amostra, consome bem menos reagente e além de proporcionar a análise de especiação por diferença.

O emulsionamento das amostras de ovos, buscando uma melhor solubilização e homogeneidade do sistema, com posterior adsorção dos analitos pela resina, provou ser uma maneira simples, bastante rápida e barata para o tratamento da amostra. Como não há nenhuma destruição da matéria orgânica, apenas a eliminação da interferência que esta causa, este tipo de tratamento mostrou-se adequado no tratamento de matrizes complexas. Além de não exigir a utilização de equipamentos, apenas vidrarias de laboratório e reagentes de fácil obtenção, a ausência de temperaturas elevadas desfavorece a perda de analitos por volatilização. Além disto, permitiu a determinação das espécies de Se IV naturalmente presentes nas amostras.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de alimentos é cada vez mais necessária dada sua importância na alimentação e saúde humana. Neste contexto, foi desenvolvido um método voltamétrico que possibilitou não somente a análise de zinco, cádmio, chumbo, cobre, selênio e manganês em amostras de ovos de galinha, como também a especiação de selênio. Trata-se de uma matriz complexa, devido ao seu alto teor de gordura, cujo pré-tratamento é fundamental para o sucesso da análise. Em virtude disso estudou-se três tipos de tratamento da amostra, com o intuito de se conhecer a forma mais eficaz de proceder esta etapa da análise. A digestão ácida, mais demorada e ambientalmente menos correta, permitiu a análise da matriz para determinação dos analitos de forma bastante simples. A irradiação UV mostrou-se extremamente eficiente na decomposição da matéria orgânica, reduzindo drasticamente o risco de contaminação e o tempo de abertura da amostra. O emulsionamento das amostras de ovos também foi satisfatório, apresentando-se como uma alternativa simples e barata de pré-tratamento.

A voltametria apresentou-se como uma ótima alternativa na análise da amostra, o que foi possível observar através dos gráficos de ensaios de regressão. O método desenvolvido mostrou-se eficiente, apresentou boa sensibilidade, linearidade e exatidão, proporcionou a análise de especiação de selênio, e ainda mostra-se economicamente mais viável que a técnica de AAS, podendo vir a ser substituído por este último. As determinações simultâneas e seqüenciais utilizam o mesmo volume de amostra na determinação dos analitos, e reduzem o tempo da análise. Embora questionado devido à sua toxicidade, o eletrodo de mercúrio é amplamente empregado por satisfazer as condições desejáveis a um eletrodo de trabalho, como estabilidade, superfície reprodutível e ampla faixa de potenciais. (HENZE & THOMAS, 2001; DO NASCIMENTO *et al*, 2009). Utilizando o eletrodo de mercúrio, conseguimos obter uma superfície nova, limpa e homogênea a cada medida voltamétrica.

O desenvolvimento de métodos que permitam a análise segura de matrizes alimentares visando atestar a qualidade das mesmas, é de fundamental importância. Através dos resultados obtidos para as amostras analisadas, é possível estudar

formas de melhorar a qualidade nutricional dos ovos de galinha, visando o benefício das aves, da população e do meio ambiente.

## 7. CONCLUSÕES

A investigação da qualidade dos alimentos é de fundamental importância, dado o papel que estes desempenham no organismo humano. O conhecimento da composição mineral dos ovos de galinha se faz necessário, uma vez que este alimento é consumido rotineiramente pela população. Todavia, a análise desta matriz é considerada um desafio analítico devido as suas características.

Um método voltamétrico foi desenvolvido, possibilitando a determinação de Zn, Cd, Pb, Cu, Se e Mn em amostras de ovos de galinha. Devido a complexidade da matriz, foram estudadas três formas de tratamento da amostra: digestão ácida, digestão com radiação UV e formação de emulsão. Os três tratamentos investigados demonstraram-se satisfatórios, uma vez que não levaram a resultados diferentes na concentração dos analitos após a análise. O método apresentou bons limites de detecção e quantificação, ampla faixa linear e boa recuperação dos analitos.

A análise comparativa do método desenvolvido com a técnica de absorção atômica, geralmente empregada na análise do conteúdo mineral desta matriz, permitiu concluir que os dois métodos são equivalentes.

O método proposto por voltametria permitiu, ainda, a determinação das espécies de Se(IV) e Se(VI) presentes nas amostras (análise de especiação).

## 7 REFERÊNCIAS

ALEIXO, M.L. **Voltametria: Conceitos e Técnicas**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química S.P.C.P. 6154, 2003. Disponível em <http://www.chemkeys.com>. Acesso em 11/07/2012.

AL-KEDHAIRY, A.A.; AL-ROKAYAR, S.A.; AL-MISUED, F.A. Cadmium toxicity on cells stress response. **Pakistan Journal Biology Sciences**, v.4, p. 1046, 2001.

ARAÚJO, J.A.; DA SILVA, H.V.; AMÂNCIO, A.L.L.; LIMA, C.B.; DE OLIVEIRA, E.R.A. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, p.53, 2008.

BARCELOS, T.D.J. Cobre: vital ou prejudicial para a saúde humana?. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 2008.

BRAZIL, Anvisa, RDC nº 42 de 29 de agosto de 2013.

BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutrition**, v. 4, p.593, 2001.

BRULAND, K.W.; ROITZ, J.S. Determination of dissolved manganese(II) in coastal and estuarine waters by differential pulse cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 344, p.175, 1997.

BURGUERA, J. L.; Burguera, M. Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, v. 96, p. 11, 2012.

CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G. R. O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Quim. Nova**, v. 26, p. 913, 2003.

CRISPONI, G.et al. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p.876, 2010.

DE CARVALHO, L.M. et al. Determinação voltamétrica de metais em águas e fluidos biológicos empregando mineralização de amostras com radiação ultravioleta. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1336, 2008.

DE CARVALHO, L.M.; SCHWEDT, G.; HENZE, G.; SANDER, S. Redox speciation of selenium in water samples by cathodic stripping voltammetry using an automated flow system. **Analyst**, v. 124, p. 1803, 1999.

DI, J.; ZHANG, F. Voltammetry determination of trace manganese with pretreatment glassy carbon electrode by linear sweep voltammetry. **Talanta**, v. 60, p. 31, 2003.

DO NASCIMENTO, P.C. et al. Voltammetric determination of Se(IV) and Se(VI) in saline samples - Studies with seawater, hydrothermal and hemodialysis fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 648, p. 162, 2009.

EL-MAALI, N. A.; EL-HADY, D. A. Square-wave adsorptive stripping voltammetry at glassy carbon electrode for selective determination of manganese. Application to some industrial samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, p. 239, 1998.

FERRI, T.; FAVERO, G. Selenium speciation in foods: preliminary results in potatoes. **Microchem. J.**, v. 85, p. 222, 2007.

GIANNENAS, I. et al. Trace mineral content of conventional, organic and courtyard eggs analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Food Chemistry**, v. 114, p. 706, 2009.

GRABARCZYK, M. A catalytic adsorptive stripping voltammetric procedure for trace determination of Cr(VI) in natural samples containing high concentrations of humic substances. **Anal. Bioanal. Chem.**, V. 390, p. 979, 2008.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**, 6ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A., Rio de Janeiro – RJ, 2005.

HENZE, G.; THOMAS, F.G. **Introduction to Voltammetric Analysis: Theory and Practise**. Collingwood/Victoria: CSIRO Publishing, 2001.

HERRON, K. L., & FERNANDEZ, M. L. Are the current dietary guidelines regarding egg consumption appropriate? **The Journal of Nutrition**, v.134, p. 187, 2004.

IEGGLI, C.V.S. et al. Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in emulsified egg samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v 80, p. 1282, 2010.

IEGLI, C.V.S. et al. Surfactant/oil/water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 605, 2009.

JANOS, P. Separation methods in the chemistry of humic substances. **J. Chromatogr. A**, v. 983, p. 1, 2003.

JUBERG, D.R.; KLEIMAN, C.F.; KWON, S.C. Position paper of the America Council on Science and Health: Lead and Human Health. **Ecotox. Environm. Safety**, n.38, p.162-180, 1997.

KASSIS, N.M.; BEAMER, S.K.; MATAK, K.E.; TOU, J.C.; JACZYNSKI, J. Nutritional composition of novel nutraceutical egg products developed with omega-3-rich oils. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.1204, 2010

KILIÇ, Z. et al. Determination of lead, copper, zinc, magnesium, calcium and iron in fresh eggs by atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 76, p. 107, 2002.

KORN, M. G. A. et al. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods — A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p.67, 2008.

KÜÇÜKYILMAZ, K. et al. Effect of an organic and conventional rearing system on the mineral content of hen eggs. **Food Chemistry**, v. 132, p. 989, 2012.

LAGRIFFOUL, A. et al. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll content and activities of stress related enzymes in young maize plants. **Plant and Soil**, v.200, p. 241, 1998.

LEACH, R.M. Manganese and glycosyltransferases essential for skeletal development. In: SCHARAMM, V.L.; WEDLER, F.C. **Manganese in metabolism and enzyme function**. New York: Academic Press, p. 81-91, 1986.

LEE, A., & GRIFFIN, B. Dietary cholesterol, eggs and coronary heart disease risk in perspective. **Nutrition Bulletin**, v.31, p. 21, 2006.

LEPANE, V. Comparison of XAD resins for the isolation of humic substances from seawater. **J. Chromatogr. A**, v. 845, p. 329, 1999.

LESSON, S.; SUMMERS, J.D. **Nutrition of the Chicken**. 4.ed. Guelph, Ontario: University Books, p. 591, 2001.

LOCATELLI, C. Trace level voltammetric determination of manganese, iron and chromium in real samples in the presence of each other. **Talanta**, v. 43, p.45, 1996.

LOCATELLI, C. Heavy Metals in Matrices of Food Interest: Sequential Voltammetric Determination at Trace and Ultratrace Level of Copper, Lead, Cadmium, Zinc, Arsenic, Selenium, Manganese and Iron in Meals. **Electroanalysis**, v. 16, p. 1478, 2004.

LOCATELLI, C.; TORSI, G. Analytical procedures for the simultaneous voltammetric determination of heavy metals in meals. **Microchemical Journal**, v. 75, p. 233, 2003.

LOCATELLI, C.; TORSI, G. Determination of Se, As, Cu, Pb, Cd, Zn and Mn by anodic and cathodic stripping voltammetry in marine environmental matrices in the presence of reciprocal interference. Proposal of a new analytical procedure. **Microchemical Journal**, v.65, p.293, 2000.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. REVIEW: The importance of zinc in human nutrition. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 17, p. 79, 2004.

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. **Quim. Nova**, v. 24, p. 87, 2001.

MANJUSHA, R.; DASH, K.; KARUNASAGAR, D. UV-photolysis assisted digestion of food samples for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). **Food Chemistry**, v. 105, p. 260, 2007.

MCCARTNEY, E. Trace mineral in poultry nutrition-1. Sourcing safe minerals, organically? **World Poultry**, v. 24, p. 14, 2008.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**, Ellis-Howood, New York, 4th edn, 1994.

MINE, Y. Emulsifying characterization of hens egg yolk proteins in oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.12, p.409, 1998.

MOREIRA, F.R., MOREIRA, J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Rev Panam Salud Publica**. 2004;15(2):119–29.

NARDI, E.P. et al. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. **Food Chemistry**, v. 112, p. 727, 2009.

NIMALARATNE, C.; LOPES-LUTZ, D.; SCHIEBER, A.; WU, J. Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 129, p. 155, 2011.

KOVACS-NOLAN, J., PHILLIPS, M., MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8421, 2005.

NOLLET, L.; VAN DER KLIS, J.D.; LENSING, M.; SPRING, P.; The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. **J APPL POULT RES**, v.16, p. 592, 2007.

OHURA, H. et al. Potentiometric flow injection determination of manganese(II) by using a hexacyanoferrate(III)/hexacyanoferrate(II) potential buffer. **Talanta**, v. 60, p. 177, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Elementos traço na nutrição e saúde humana**. Genebra, 1998.

PAN, T.L. et al. Skin toxicology of lead species evaluated by their permeability and proteomic profiles: A comparison of organic and inorganic lead. **Toxicol. Lett.**, n.197, p.19-28, 2010.

PAUL, B. K.; MOULK, S. P. Uses and applications of microemulsions. **Current Science**, v. 80, p. 990, 2001.

PIECH, R. et al. The cyclic renewable mercury film silver based electrode for determination of manganese(II) traces using anodic stripping voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, p. 43, 2008.

PIERANGELI, M.A.P. et al. Comportamentos ortivo, individual e competitivo de metais pesados em latossolos com mineralogia contrastante. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.819, 2007.

PINTO, L.; LEMOS, S.G. Multivariate optimization of the voltammetric determination of Cd, Cu, Pb and Zn at bismuth film. Application to analysis of biodiesel. **Microchemical Journal**, v. 110, p.417, 2013.

QURESHI, A.I.; SURI, F.K.; AHMED, S.; NASAR, A.; DIVANI, A.A.; KIRMANI, J.F. Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2007.

REILLY, C. **Metal Contamination of Food**. London: Elsevier, p. 284, 1991.

RICHARDS, M.P. Trace Mineral Metabolism In The Avian Embryo. **Poultry Science**, v. 76, p.152, 1997.

RUTZ, F.; MURPHY, R. Minerais orgânicos para aves e suínos. I Congresso Internacional sobre o uso da Levedura na Nutrição Animal, CBNA, 17 e 18 DE SETEMBRO DE 2009, CAMPINAS, SP.

SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos Metais. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo. Ed. Atheneu, 1996.

SALMENPERA, L. **clin. Biochem.**, v. 30, p. 115, 1997.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Características dos ovos. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES; Pró-reitoria de Extensão - Programa Institucional de Extensão. **Boletim Técnico**

SAVORY, J.; WILLIS, M.R. **Clin. Chem.**, v.38, p. 1565, 1992.

SECHINATO, A.S.; ALBUQUERQUE, R.; NAKADA, S. Efeito da suplementação dietética com micro minerais orgânicos na produção de galinhas poedeiras. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 43, p.159, 2006.

SKOOG, D.A.; West, D.M.; Holler, J.F. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª edição, editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

van STADEN, J.F.; MATOETOE, M.C. Simultaneous determination of copper, lead, cadmium and zinc using differential pulse anodic stripping voltammetry in a flow system. **Analytica Chimica Acta**, v. 411, p. 201, 2000.

TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M. Avaliação de exposição da populações humanas a metais pesados no ambiente. Exemplos do Recôncavo Baiano. **Química Nova**, v.15, p.147, 1992.

TÔRRES, A.P. **Alimentação das aves**. 1.ed. São Paulo: Edições Melhoramentos, p. 259, 1969.

ULUOZLU, O.D. et al. Assessment of trace element contents of chicken products from turkey. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 982, 2009.

UNDERWOOD, E.J. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3. ed. Wallingford: CABI, p. 614, 1999.

UNDERWOOD, E.J. **The mineral nutrition of livestock**. 2.ed. London: Cammon Wealth Agricultural Bureaux, p. 180, 1981.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf> , acessado em 01/04/2014.

WHO. World Health Organization. **Air Quality Guidelines**. 2<sup>nd</sup> edition. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000. Disponível em: <[http://www.euro.who.int/document/aiq/6\\_3cadmium.pdf](http://www.euro.who.int/document/aiq/6_3cadmium.pdf)>. Acesso em: 11/02/2013.

WHO. World Health Organization. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, p. 563, 2004. Disponível em: <<http://www.whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052X.pdf>>. Acesso em: 11/02/2013.

YRUELA, I. Copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.** vol. 17, p. 145, 2005.

ZUMAN, P.; SOMER, G. Polarographic and voltammetric behavior of selenious acid and its use in analysis. **Talanta**, v. 51, p. 645, 2000.