



UFSM

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO DE CHOCOLATE
E DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-OES E ICP-MS**

Jucelino Medeiros Marques Junior

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2014

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO DE CHOCOLATE E DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-OES E ICP-MS

por

Jucelino Medeiros Marques Junior

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO DE CHOCOLATE
E DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-OES E ICP-MS**

Elaborada por

Jucelino Medeiros Marques Junior

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM-RS)

Prof. Dr. Adilson Ben da Costa (UNISC-RS)

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte (UFSM-RS)

***Dedico este trabalho aos
meus pais e aos meus irmãos***

AGRADECIMENTOS

À **UFSM** pela possibilidade de formação profissional e ao **Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação, pelas oportunidades proporcionadas ao longo da minha trajetória acadêmica, além da transmissão de conhecimentos e exemplo profissional.

Ao Prof. **Adilson Ben da Costa**, pela participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. **Fábio Andrei Duarte**, pelas contribuições e sugestões como banca examinadora.

Aos demais professores e colegas do **Setor de Química Industrial e Ambiental**. Em especial, agradeço aos colegas **Lucas Schmidt** e **Cristiano Cabral** pela disponibilidade e atenção na execução das tarefas laboratoriais. Agradeço a **Suelem Kaczala**, **Camila Knorr** e **Paula Balestrin** pela amizade e apoio e, especialmente, a **Franciéli Schons** pelo companheirismo em todos os momentos.

Um especial agradecimento a Prof^a. **Carmen Luisa Kloster** pela amizade, incentivo e exemplo profissional.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, **Ademir** e **Valéria**, pelo auxílio e dedicação sempre oferecidos.

Aos amigos, **Ederson Abaide**, **Tiago Laber**, **Gabriel Capeletto**, **Daniela Ribeiro**, **Sandra da Luz**, **Jo Ellen da Luz** e **Annelena da Luz** pela amizade e palavras confortantes em todos os momentos.

Aos meus pais, **Jucelino** e **Maria Denise**, e irmãos, **Anderson** e **João Baptista**, pelo apoio incondicional e incentivo de sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Chocolate: generalidades.....	4
2.2. Elementos presentes no chocolate e fontes de contaminação	5
2.3. Aspectos regulatórios.....	8
2.4. Métodos de preparo de amostra e técnicas para posterior determinação de metais em chocolate	8
2.4.1. Decomposição por via úmida em sistema aberto	12
2.4.1.1. Decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional	12
2.4.2. Decomposição por via úmida em sistema fechado	14
2.4.3. Combustão.....	16
2.4.3.1. Combustão por via seca.....	16
2.4.3.2. Combustão em sistema fechado	17
2.4.3.2.1. Combustão iniciada por micro-ondas	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Instrumentação	22
3.2. Programas computacionais.....	24
3.3. Reagentes.....	25
3.4. Amostras e materiais de referência certificados.....	26
3.5. Decomposição por via seca	27

3.6. Decomposição por via úmida em sistema aberto utilizando bloco digestor.....	28
3.7. Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas.....	28
3.8. Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação	29
3.9. Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas	29
3.10. Determinação por ICP-OES utilizando nebulização ultrassônica	30
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	31
4.1. Avaliação dos métodos de decomposição de chocolate	32
4.2. Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas	38
4.2.1. Avaliação da massa de amostra	38
4.2.2. Avaliação da concentração de HNO ₃	40
4.3. Avaliação dos parâmetros do nebulizador ultrassônico	43
4.3.1. Avaliação da vazão da bomba peristáltica	44
4.3.2. Avaliação da potência	44
4.3.3. Avaliação da vazão do gás auxiliar	45
4.3.4. Avaliação da vazão do gás de nebulização	45
4.3.5. Avaliação da temperatura do tubo em U e da temperatura do condensador.....	46
4.4. Comparação dos resultados para Cd, Co, Cr, Ni e Pb obtidos por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES	48
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapa de avaliação dos métodos de decomposição do chocolate.27
- Figura 2.** Concentração de Cd, Co, Cr, Ni e Pb na amostra de chocolate após decomposição por via seca, decomposição por via úmida em sistema aberto, MAWD e SRC MAWD e determinação por ICP-MS.....33
- Figura 3.** Comparação dos valores obtidos para Cr e Ni por ICP-MS e PN-ICP-OES na amostra de chocolate após decomposição por via seca, decomposição por via úmida em sistema aberto, MAWD e SRC MAWD.....37
- Figura 4.** Pressão máxima atingida no sistema em função da massa de chocolate utilizada na decomposição por MIC (n=3).39
- Figura 5.** Concentração de Cd, Co, Cr, Ni e Pb na amostra de chocolate após decomposição por MAWD-2 e MIC e determinação por ICP-MS.....42
- Figura 6.** Comparação dos valores obtidos para Co, Cr e Ni por ICP-MS e PN-ICP-OES após decomposição por MIC.43
- Figura 7.** Comparação dos valores para Cd após determinação por ICP-MS e USN-ICP-OES.49
- Figura 8.** Comparação dos valores para Co após determinação por ICP-MS, USN-ICP-OES e PN-ICP-OES.....50
- Figura 9.** Comparação dos valores para Cr após determinação por ICP-MS, USN-ICP-OES e PN-ICP-OES.....50
- Figura 10.** Comparação dos valores para Ni após determinação por ICP-MS, USN-ICP-OES e PN-ICP-OES.52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças entre os tipos de chocolate mais comercializados (adaptado de Farah ^{17a}).....	5
Tabela 2. Concentração de alguns elementos presentes no chocolate preto.....	6
Tabela 3. Classificação dos métodos de decomposição de amostras (adaptado de Knapp ⁴⁶).....	10
Tabela 4. Resumo de alguns métodos para extração e decomposição de amostras sólidas e subsequente determinação elementar (adaptado de EPA ⁴⁷).....	11
Tabela 5. Decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional como método de preparo de amostra para chocolate.	13
Tabela 6. Decomposição por via úmida em sistema fechado com aquecimento por radiação micro-ondas como método de preparo de amostra para chocolate.	15
Tabela 7. Condições de operações recomendadas e faixas para análises de amostras aquosas sem a membrana de dessolvatação para USN-ICP-OES (adaptado de Cetac Technologies ⁷⁰).....	23
Tabela 8. Condições operacionais para a determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por PN-ICP-OES e ICP-MS.	24
Tabela 9. Informações nutricionais do chocolate.	26
Tabela 10. Resultados ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos para o CRM 1549 e CRM 8435 pelo método MAWD-2.....	38

Tabela 11. Condições escolhidas após a avaliação dos parâmetros do nebulizador ultrassônico.....	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOAC, Associação Oficial de Químicos Analíticos, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEN, Comitê Europeu para Padronização, do inglês *Committee European for Standardization*

CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*

EPA, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *The United States Environmental Protection Agency*

FAO, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*

FI-CV-ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vapor frio e injeção em fluxo, do inglês *flow injection cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry*

FI-HG AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e injeção em fluxo, do inglês *flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry*

FI-HG-ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de hidretos e injeção em fluxo, do inglês *flow injection hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry*

GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

HR-ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado de alta resolução, do inglês *high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

LD, limite de detecção

LQ, limite de quantificação

MAWD, decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted wet digestion*

MIC, combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave induced combustion*

PTFE, politetrafluoretileno, do inglês *polytetrafluorethylene*

PN, nebulização pneumática, do inglês *pneumatic nebulization*

RCC, teor de carbono residual, do inglês *residual carbon content*

SRC MAWD, decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação, do inglês, *single reaction chamber microwave-assisted wet digestion*

USN, nebulização ultrassônica, do inglês *ultrasonic nebulization*

XRF, fluorescência de raios X, do inglês *X ray fluorescence*

RESUMO

Neste trabalho, foram avaliados os principais métodos de preparo de amostra reportados na literatura para a decomposição de chocolate e, adicionalmente, foi proposta a decomposição por combustão iniciada por micro-ondas (MIC) para posterior determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com nebulização pneumática (PN-ICP-OES) e ultrassônica (USN-ICP-OES). MAWD foi dividida da seguinte forma: (MAWD-1) 300 mg de amostra + 6 mL de HNO₃ concentrado + 1 mL de H₂O₂ (30%), (MAWD-2) 300 mg de amostra + 6 mL de HNO₃ concentrado, (MAWD-3) 500 mg de amostra moída (pó) + 6 mL de HNO₃ concentrado + 1 mL de H₂O₂ (30%) e (MAWD-4) 300 mg de amostra + 4 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de HCl. Além disso, foi feita a decomposição utilizando sistema com câmara única de reação (SRC MAWD). Na MIC foi avaliada a massa de amostra e a concentração de HNO₃ como solução absorvedora. O procedimento MAWD-3 apresentou concordância dos valores para todos os analitos após determinação por ICP-MS com os demais procedimentos por MAWD e SRC MAWD. Além disso, o teor de carbono residual (RCC) após decomposição por MAWD-3 foi de $1,4 \pm 0,1\%$ não apresentando diferença significativa com os demais procedimentos por MAWD. Desta forma, na decomposição do chocolate por MAWD poderia se usar até 500 mg de amostra sem necessidade de moagem. Na decomposição do chocolate por via seca foram observadas perdas para Cd e na decomposição por bloco digestor o teor de RCC foi de 14%. Na MIC foi possível a decomposição de até 500 mg de chocolate com HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora e o teor de RCC foi de $0,20 \pm 0,02\%$, seis vezes menor quando comparado aos procedimentos por MAWD. Houve concordância dos resultados para Cr e Ni obtidos por PN-ICP-OES comparado com os resultados obtidos por ICP-MS para quase todos os métodos de preparo avaliados. Os valores para Cd e Pb ficaram abaixo do limite de detecção (LD) por PN-ICP-OES. Na decomposição de material de referência certificado (CRM) de leite em pó integral por MAWD-2 e determinação por ICP-MS foram observadas concordâncias da ordem de 107, 104 e 91% para Co, Cr e Pb, respectivamente, e concordâncias da ordem de 97 e 95% para Co e Pb, respectivamente, com CRM de leite sem gordura. Os LDs obtidos para Cd, Co e Cr por USN-ICP-OES apresentaram uma melhora significativa quando comparado com os LDs obtidos por PN-ICP-OES. Para Pb houve uma melhora por um fator de até dez vezes nos LDs para USN-ICP-MS quando comparado com PN-ICP-OES. Contudo, a determinação de Ni não foi possível por USN-ICP-OES. Desta forma, os métodos MAWD-3 e MIC 7 mol L⁻¹ mostraram-se satisfatórios para a decomposição de até 500 mg de chocolate, com tempos de decomposição inferiores aos sistemas abertos e a possibilidade de determinação de Cd, Co, Cr e Pb por ICP-MS ou USN-ICP-OES.

ABSTRACT

In this work, was evaluated the main methods of sample preparation reported in the literature for decomposition of chocolate and, in addition, was proposed the decomposition by microwave induced combustion (MIC) for further determination of Cd, Co, Cr, Ni and Pb by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and pneumatic nebulization with inductively coupled plasma optical emission spectrometry (PN-ICP-OES) and ultrasonic nebulization (USN-ICP-OES). MAWD was splitted in 4 ways: (MAWD-1) 300 mg of sample + 6 mL concentrated HNO_3 + 1 mL of H_2O_2 (30%), (MAWD-2) 300 mg of sample + 6 mL concentrated HNO_3 , (MAWD-3) 500 mg of ground sample (powder) + concentrated HNO_3 + 1 mL of H_2O_2 (30%) and (MAWD-4) 300 mg of sample + 4 mL concentrated HNO_3 + 2 mL concentrated HCl. Moreover, the decomposition was performed in a closed system using single reaction chamber (SRC MAWD). In the MIC was evaluated the mass of the sample and the HNO_3 concentration as absorption solution. The procedure MAWD-3 presented agreement of values for all analytes after determination by ICP-MS with other procedures MAWD and SRC MAWD. Besides, the residual carbon content (RCC) after decomposition by MAWD-3 was $1.4 \pm 0.1\%$ without significant difference with the other procedures MAWD. Thus, the decomposition of chocolate by MAWD could be used up to 500 mg of sample without grinding. In the decomposition of chocolate by dry ashing was observed losses for Cd and in the decomposition in open vessels the RCC was 14%. In the MIC was possible to decompose up to 500 mg of chocolate with 7 mol L^{-1} HNO_3 as absorption solution and the RCC value was $0.20 \pm 0.02\%$, six fold lower compared to the MAWD procedures. There was agreement in the results for Cr and Ni obtained by PN-ICP-OES compared with the results obtained by ICP-MS for almost all preparation methods evaluated. The values for Cd and Pb were below the limit of detection (LD) by PN-ICP-OES. In the decomposition of certified reference material (CRM) of whole milk powder by MAWD-2 and determination by ICP-MS were observed agreement in the range of 107, 104 and 91% for Co, Cr and Pb, respectively, and agreement in the range of 97 and 95% for Co and Pb, respectively, using CRM non-fat milk. The LDs obtained for Cd, Co and Cr by USN-ICP-OES showed a significant improvement when compared with the LDs obtained by PN-ICP-OES. For Pb there was an improvement up to ten fold in the detection limits for USN-ICP-MS when compared with PN-ICP-OES. However, the determination of Ni was not possible for USN-ICP-OES. Thus, MAWD-3 and MIC 7 mol L^{-1} methods were satisfactory for decomposing up to 500 mg of chocolate, decomposition times lower than open systems and the possibility of determination Cd, Co, Cr and Pb by ICP-MS or USN-ICP-OES.

1. INTRODUÇÃO

O chocolate pode ser definido como uma suspensão de material particulado sólido, com açúcar, sólidos de cacau com ou sem sólidos de leite, em uma fase rica em gordura.¹ A semente de cacau contém vitaminas e alguns elementos que também são encontrados no chocolate e, embora os grãos sejam fermentados e submetidos a um tratamento a altas temperaturas, os elementos apresentam uma disponibilidade satisfatória nos derivados de cacau.² O chocolate tem sido considerado medicinal, tendo diversas aplicabilidades como, por exemplo, atuar como estimulante do sistema nervoso central, estimulação da atividade do estômago e rins, diminuição da fadiga mental e, também, pode ser usado para administrar fármacos com sabor desagradável.³

Segundo a legislação brasileira⁴, o chocolate deve ser obtido de matérias primas "limpas", isentas de matéria terrosa, de parasitas, detritos de animais, cascas de sementes de cacau e outros detritos vegetais. Além disso, apesar de não haver uma legislação brasileira específica para contaminantes inorgânicos no chocolate, o monitoramento de metais se faz necessário, uma vez que elementos como Cd, Cr e Pb podem ser tóxicos se ingeridos em quantidades que excedem os valores recomendados.⁵

No entanto, a determinação de metais em chocolate é, ainda, um desafio analítico em face às dificuldades que surgem devido às características da matriz. O chocolate é uma matriz que apresenta uma composição variada em função da grande diversidade de constituintes utilizados na fabricação (emulsificantes, aromatizantes, agentes de corpo, edulcorantes, etc). Alguns elementos, por exemplo, estão na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou mg kg^{-1} e o sucesso na etapa de determinação de metais é um compromisso entre o método de decomposição e a técnica para a determinação.⁶

A decomposição por via úmida em sistemas abertos para posterior determinação de metais em chocolate é um método comumente utilizado. Contudo, tal método não garante a destruição completa da matriz de amostras com alto teor de carbono e, adicionalmente, é necessário empregar um volume relativamente elevado de ácidos e longo tempo de decomposição.⁷ A decomposição por via úmida em sistemas fechados, por sua vez, oferece algumas vantagens em relação aos

sistemas abertos. Assim, os sistemas fechados permitem maiores temperaturas das soluções de decomposição além destes sistemas também minimizarem a contaminação e a perda de espécies voláteis por operarem em uma atmosfera isolada.^{8,9}

Os procedimentos baseados em reações de combustão apresentam a vantagem de converter os materiais orgânicos nos respectivos produtos de combustão usando somente oxigênio como reagente, o que minimiza o risco de contaminação.¹⁰ Assim, um outro procedimento reportado para a decomposição do chocolate é a combustão por via seca em forno tipo mufla. Apesar da simplicidade do método, alguns elementos podem ser convertidos em uma forma volátil e serem facilmente perdidos durante a decomposição.¹¹ Em contrapartida, na combustão em sistemas fechados, os inconvenientes de perdas por volatilização podem ser evitados. A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) tem apresentado algumas vantagens interessantes no que se refere ao preparo de amostras como baixo consumo de reagentes e alta eficiência de decomposição. Além disso, a MIC permite a aplicação de uma etapa de refluxo proporcionando uma efetiva lavagem das paredes internas dos frascos de combustão. Adicionalmente, ácido nítrico diluído pode ser uma adequada solução absorvedora para muitos analitos.¹²

Desta forma, no presente trabalho, foi avaliada a decomposição de chocolate por via seca, decomposição em sistema aberto com bloco digestor, decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD), decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com câmara única de reação (SRC MAWD) e MIC para a determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com nebulização pneumática (PN-ICP-OES) e ultrassônica (USN-ICP-OES). Na MIC foram avaliadas condições como massa de amostra e concentração de HNO₃ como solução absorvedora. Na determinação por USN-ICP-OES foram avaliadas parâmetros como vazão da bomba peristáltica, potência do gerador de rádio frequência, vazão do gás auxiliar, vazão do gás de nebulização, temperatura de aquecimento do tubo em U e temperatura de resfriamento do condensador.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão descritas algumas características do chocolate, os principais elementos presentes e as possíveis fontes de contaminação, bem como os aspectos regulatórios pertinentes a este produto. Em seguida, serão apresentados os métodos de preparo de amostra geralmente empregados para a decomposição de chocolate e as técnicas de determinação de metais.

2.1. Chocolate: generalidades

O chocolate é um produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa de cacau, pó e/ou manteiga de cacau, além de outros ingredientes. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados.¹³ Por algumas de suas propriedades, o chocolate tem sido considerado um alimento funcional, fonte de substâncias fitoquímicas, que promovem efeitos cardioprotetores, anti-inflamatórios, imunomoduladores e antioxidantes, reduzindo a incidência de neoplasias, doenças cardiovasculares, gástricas e reumáticas, dentre outras patologias causadas por estresse oxidativo.^{14,15} No entanto, o chocolate deve ser consumido com moderação, principalmente porque é rico em gordura saturada (encontrada em alimentos de origem animal como ovos, queijos e leite) e açúcar. Em excesso, esses constituintes podem levar ao aumento do colesterol, problemas no estômago e intestino e à obesidade.⁶

De acordo com a Portaria nº 398 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento funcional é "todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica".¹⁶ Conseqüentemente, nos últimos anos, devido ao interesse crescente dos consumidores por alimentos funcionais, tanto a indústria quanto a comunidade científica tem buscado cada vez mais informações sobre esses produtos e suas substâncias bioativas.¹

Apesar da diversidade, os tipos de chocolate mais consumidos ainda são chocolate ao leite, branco, meio amargo e amargo. Entre 2006 e 2008, o chocolate amargo (com teores de cacau acima de 56%) apresentou um crescimento nas vendas. Isto se deve ao seu sabor particular e, também, pela divulgação de seus benefícios à saúde.^{17a,18} Na Tabela 1 estão mostradas as diferenças entre os tipos de chocolates mais comercializados.

Tanto a produção quanto o consumo de chocolate tem aumentado anualmente no Brasil e no mundo.¹⁹ Alguns pontos centrais da avaliação da qualidade do chocolate são: ser sólido a temperatura ambiente, derreter rapidamente na boca e ter granulometria padronizada. Estes itens influenciam na textura e nas características reológicas do alimento afetando as percepções sensoriais.²⁰

Tabela 1. Diferenças entre os tipos de chocolate mais comercializados (adaptado de Farah^{17a}).

Tipo de chocolate	Ingredientes utilizados	Teor de cacau (%)	Valor calórico (kcal/100 g)
Ao leite	Açúcar, massa e manteiga de cacau, leite, leite em pó e condensado	20 a 39	568
Branco	Açúcar, manteiga de cacau, leite em pó e lecitina	-	549
Meio amargo	Massa e manteiga de cacau, pouco açúcar	40 a 55	550
Amargo	Massa e manteiga de cacau, pouco açúcar	56 a 85	500

Em escala industrial, o processamento usual do chocolate segue a seguinte sequência de operações unitárias: mistura de ingredientes, refino, conchagem, temperagem, seguida da cristalização da massa. Em contrapartida, o chocolate é produzido a partir de muitas receitas diferentes e contém ingredientes extras em adição aos produtos de cacau. Portanto, o valor nutricional irá variar de acordo com os ingredientes.²¹

2.2. Elementos presentes no chocolate e fontes de contaminação

O cacau é uma fonte extremamente rica de muitos elementos essenciais. Assim, o conteúdo mineral do cacau reflete o solo no qual o mesmo cresceu e os valores reportados são bastante variados.²² Na Tabela 2 está mostrada a concentração de alguns elementos presentes no chocolate preto a partir de dados da literatura.

Tabela 2. Concentração de alguns elementos presentes no chocolate preto.

Elemento	Faixa de concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Referência
Ca	324-2069	23
Cu	4,32-9,71	24
Fe	15-51	25
K	3180-13240	26
Mg	913-1550	26
Mn	2,54-14,5	27
Na	60-510	23
Ni	1,45-4,33	28
Zn	14-17	29

O cacau tem o potencial de fornecer significantes quantidades de elementos à dieta humana. Entretanto, pouco é conhecido sobre a biodisponibilidade dos elementos a partir do cacau e do chocolate. Existem os chamados antinutrientes presentes no cacau e chocolate, tais como ácido oxálico e ácido fítico, polifenóis e fibras os quais podem interferir na absorção de minerais. Por exemplo, ácido oxálico combina-se com Ca no intestino para formar oxalato de cálcio o qual é bastante insolúvel. Ácido fítico pode formar complexos com Ca, Fe e Zn no intestino e estes complexos são bastante insolúveis. Além desses, os polifenóis são conhecidos quelantes de vários metais de transição e podem afetar a ligação metal-proteína e, portanto, também têm potencial para diminuir a absorção mineral.³⁰

Uma potencial fonte de contaminação de metais em chocolates pode ser a partir da captação do solo, deposição nos grãos em função de contaminação da atmosfera local, adsorção dos íons a partir do solo durante a etapa de secagem, contaminação a partir das ferramentas de moagem utilizadas nas indústrias e contaminação do ar durante o processamento do cacau.⁶

O Ni é um dos principais contaminantes resultantes do processo de manufatura do chocolate, uma vez que no processo de endurecimento da barra é utilizado Ni como catalisador na reação de hidrogenação da gordura. Além disso, a manteiga de cacau é outro ingrediente que pode conter altas concentrações de Ni.³¹ Outras rotas para possíveis contaminações por este metal estão no armazenamento da matéria prima em containeres à base de Ni.³² Em quantidades traço Ni pode ser benéfico como um ativador de sistemas enzimáticos.³³ Contudo, em altas

concentrações, o Ni pode se acumular nos pulmões e causar hemorragias gástricas.³⁴ Entretanto, compostos de Ni não são considerados carcinógenos aos animais e humanos, mas a possibilidade de que o Ni possa atuar como um promotor de neoplasias tem sido reportada.³⁵

O chocolate passa por diferentes processos industriais e são embalados para fornecer um meio de proteger o produto e na maioria das embalagens são impressos com tintas de cores variadas.³⁶ Alguns metais como Pb e Cr podem migrar da embalagem para a superfície de alimentos em certas condições.³⁷ As embalagens empregadas no mercado nacional para o acondicionamento de barras de chocolate de 30 e 100 g são normalmente compostas de estrutura de polipropileno biorientado com sistema de selagem a frio. Este sistema de selagem é o ideal para produtos sensíveis ao calor, além de proporcionar ganhos de velocidade no acondicionamento.³⁸

O Cd é conhecido por ser acumulado por absorção foliar e radicular em grãos de cacau. O metal é mobilizado pela ação de minhocas em uma espessa camada de folhas de cacau, provavelmente, ricos em Cd. O nível de Cd nos grãos também é afetado pelas atividades de mineração na área e pela aplicação de fertilizantes no solo.³⁹ Quando Cd é ingerido em quantidades excessivas, ele pode induzir alguns sintomas como dores gastrintestinais, náusea, angústia, diarreia, dano hepático e hipertensão.²⁶

O Co é um elemento que está naturalmente presente em rochas, solos e água e é geralmente encontrado em associação com o Ni. É essencial em quantidades traço para humanos e outros mamíferos porque é um dos componentes da vitamina B₁₂ e a deficiência pode se manifestar através de anemias e problemas no sistema nervoso.⁴⁰ Apesar de não ser altamente tóxico, em doses altas pode produzir edema pulmonar e a exposição crônica pode levar a anormalidades da tireoide.⁴¹

Diante do exposto, faz-se necessário um controle da presença destes metais em amostras de chocolate. Uma vez que a população mais propensa aos efeitos tóxicos são as crianças, um dos principais consumidores do produto, já que não apresentam os mecanismos fisiológicos de depuração destes metais em total estágio de amadurecimento como nos adultos.

2.3. Aspectos regulatórios

Uma vez que o chocolate é um dos alimentos com elevado consumo ao redor do mundo, os consumidores não se preocupam apenas com o valor nutricional do produto, mas também com relação à segurança e qualidade proporcionados para uma ingestão segura.²⁵ O conteúdo de elementos traço em grãos de cacau e, por conseguinte, no chocolate, podem variar por muitos motivos e são afetados por fatores como: variedade da colheita, fertilização, origem genética dos grãos, variação sazonal, condições de armazenamento dos grãos, processamento da colheita e poluição ambiental.⁴²

Além disso, os limites máximos permitidos para muitos metais diferem e ainda estão sendo avaliados em muitos países. A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e a *Committee European for Standardization* (CEN) disponibilizam alguns métodos que podem ser aplicados para amostras de chocolate, mas nenhum deles contempla a determinação de metais.⁶

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) as concentrações permitidas para As e Pb em produtos de cacau e derivados são 1 e 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Ainda, segundo a FAO, as concentrações permitidas para As, Cu, Fe e Pb na manteiga de cacau são 0,1, 0,4, 0,5 e 0,1 mg L^{-1} , respectivamente.⁴³

2.4. Métodos de preparo de amostra e técnicas para posterior determinação de metais em chocolate

Na sequência analítica, uma das primeiras etapas consiste em submeter à amostra a um tratamento adequado com vistas à preparação da mesma para as etapas subsequentes. Cabe ressaltar que a etapa de preparo de amostra, dentre as várias etapas da sequência analítica, carece de uma atenção especial, pois podem ocorrer erros os quais podem repercutir em todo o experimento. Como exemplo, podem ocorrer perdas de analito por volatilização, contaminação por diversas fontes, adsorção e/ou dessorção do analito, decomposição ou dissolução incompleta, entre outros.^{44a}

Além destas características, um método de decomposição deve contemplar características como simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de ácidos e produzir resultados precisos e exatos. Logo, o método mais adequado para decompor uma amostra para análise depende da natureza da amostra, do analito, bem como sua concentração, da técnica de determinação e, finalmente, da precisão e exatidão desejadas.⁴⁵ Assim, Knapp⁴⁶ propôs uma classificação dos métodos de decomposição de amostras conforme mostrado na Tabela 3.

Os métodos oficiais de análise são designados por grupos de amostras classificados de acordo com sua natureza ou classificados para um analito específico. Os métodos recomendados pela *The United States Environmental Protection Agency*⁴⁷ (EPA) para amostras sólidas e posterior determinação de metais usando técnicas de espectrometria atômica e que poderiam ser aplicados para amostras de chocolate estão mostrados na Tabela 4.

Por conseguinte, dentre os principais métodos de preparo de amostra reportados na literatura para a determinação de metais em chocolate destacam-se decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional, decomposição por via úmida em sistema fechado com aquecimento por radiação micro-ondas e combustão por via seca.^{25,29,48-51}

Tabela 3. Classificação dos métodos de decomposição de amostras (adaptado de Knapp⁴⁶).

Procedimento de decomposição	Classificação
Fusão	
Decomposição por via úmida	<i>Em sistemas abertos</i>
	Com aquecimento convencional
	Aquecimento por radiação micro-ondas
	<i>Em sistemas fechados</i>
	Com aquecimento convencional
	Aquecimento por radiação micro-ondas
	<i>Em sistemas em fluxo</i>
	Com aquecimento convencional
	Aquecimento por radiação micro-ondas
Combustão	<i>Em sistema aberto</i>
	Tubo de combustão
	Decomposição por via seca
	Decomposição à baixa temperatura com oxigênio excitado (Cool Plasma Asher [®])
	Sistema Wickbold com chama hidrogênio-oxigênio
	<i>Em sistema dinâmico</i>
	Trace-O-Mat [®]
	<i>Em sistema fechado</i>
	Frasco de combustão de Schöniger
	Bomba de Combustão
	Combustão iniciada por micro-ondas

Tabela 4. Resumo de alguns métodos para extração e decomposição de amostras sólidas e subsequente determinação elementar (adaptado de EPA⁴⁷).

Método	Método	Matriz	Reagentes e condições	Elementos	Técnica de determinação
EPA 3031	Decomposição ácida (sistema aberto)	Óleos, ceras e produtos de petróleo	0,5 g de amostra misturada com 0,5 g de permanganato de potássio e adição de 10 mL de H ₂ SO ₄ . Após, adição de 2 mL de HNO ₃ concentrado e 10 mL de HCl concentrado	Ag, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Se, Sb, Pb, Tl, V e Zn	F AAS ICP-OES
EPA 3050A	Decomposição ácida (sistema aberto)	Sedimentos e óleos	1-2 g de amostra <i>in natura</i> e adição de 10 mL de HNO ₃ concentrado + 3 mL de H ₂ O ₂	As, Be, Cd, Co, Cr, Fe, Mo, Pb, Se, e Tl	GF AAS ICP-MS
EPA 3050B	Decomposição ácida (sistema aberto)	Sedimentos e óleos	1-2 g de amostra <i>in natura</i> e adição de 10 mL de HNO ₃ concentrado + 3 mL H ₂ O ₂ + 10 mL de HCl concentrado	Ag, Al, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Tl, V e Zn	F AAS ICP-OES
EPA 3051	Decomposição ácida assistida por micro-ondas (sistema fechado)	Sedimentos, solos e óleos	0,25 - 0,5 g de amostra + 10 mL de HNO ₃ concentrado	Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Tl, V e Zn	F AAS GF AAS ICP-OES
			0,25 - 0,5 g de amostra + 9 mL de HNO ₃ concentrado + 3 mL de HCl concentrado	Ag, Al, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Tl, V e Zn	F AAS ICP-OES

2.4.1. Decomposição por via úmida em sistema aberto

A decomposição de materiais orgânicos ou biológicos por via úmida, em geral, implica em aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos oxidantes, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. Ácido nítrico é um ácido forte e um agente oxidante bastante poderoso e, além disso, quase todos os nitratos são solúveis em água. Para ajudar na dissolução de alguns metais poderia adicionar espécies complexantes como o HCl às soluções de HNO₃. Vale destacar que o HCl não apresenta propriedades oxidantes e a maioria dos cloretos metálicos são solúveis em água. Já a adição de pequenas quantidades de H₂O₂ às soluções de HNO₃ é bastante comum como tratamento final para a remoção de produtos coloridos que permanecem em solução. Além disso, o poder oxidante de um ácido, como o HNO₃, poderia ser aumentado pela utilização de um oxidante auxiliar como o H₂O₂.^{44b}

2.4.1.1. Decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional

Neste método de decomposição são utilizados blocos digestores ou chapas de aquecimento. Na comparação com os métodos de decomposição por via seca, a decomposição por via úmida é considerada mais rápida, porém a temperatura máxima que pode ser alcançada é limitada pela temperatura de ebulição do ácido. No caso do ácido nítrico, o aquecimento não excede 122 °C, o que é insuficiente para a decomposição de algumas amostras que exigem temperaturas elevadas para a decomposição, muitas vezes na faixa de 300 °C.^{52a}

Na Tabela 5 estão mostrados alguns trabalhos nos quais a decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional é aplicada para amostras de chocolate.

Tabela 5. Decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional como método de preparo de amostra para chocolate.

Amostra	Analitos	Preparo da amostra	Técnica de determinação	Observações
Chocolate em barra ²⁹	Cd, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn	2 g de amostra homogeneizada, 10 mL de HNO ₃ concentrado e 15 mL de HClO ₄ . A mistura foi aquecida até 200 °C por cerca de 3 a 4 h	F AAS ^a (Cu, Fe e Zn) e GF AAS ^b (Cd, Ni e Pb)	Os limites de detecção (LDs) foram de 0,001 µg g ⁻¹ para Cd, 0,004 µg g ⁻¹ para Cu, 0,009 µg g ⁻¹ para Fe, 0,001 µg g ⁻¹ para Ni, 0,001 µg g ⁻¹ para Pb e 0,001 µg g ⁻¹ para Zn
Chocolate em barra ²⁵	Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	0,5 g de amostra e 5 mL de HNO ₃ concentrado. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 70 °C por 1 h e, após resfriamento, foi adicionado 1,5 mL de HClO ₄ seguido de aquecimento até 240 °C	F AAS (Cu, Fe, Mn e Zn) e GF AAS (Cd, Ni e Pb)	Os valores encontrados para Pb e Cd estavam acima dos limites preconizados para uma ingestão diária segura
Gomas de chocolate ⁵¹	Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Fe e Pb	1 g de amostra, 6 mL de HNO ₃ concentrado e 2 mL de H ₂ O ₂ . Após, aquecimento a 100°C por 1 h	F AAS	Os autores observaram que quando HNO ₃ concentrado e H ₂ O ₂ eram usados separadamente, era observado que as amostras não eram digeridas suficientemente
Balas de chocolate ⁵³	Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Mn e Pb	10 g de amostra e adição de HNO ₃ + HCl (1 mL + 5 mL)	F AAS	Os valores encontrados apenas para Fe e Mn estavam acima dos limites preconizados para uma ingestão diária segura
Balas de chocolate ²⁸	Cd, Ni e Pb	0,5 g de amostra e adição de uma mistura de 2 mL de HNO ₃ concentrado e H ₂ O ₂ (30%). Em seguida, as amostras foram submetidas a aquecimento em bloco digestor por cerca de 2 a 3 h	ET AAS ^c	LDs: 0,0025 µg g ⁻¹ para Cd, 0,0075 µg g ⁻¹ para Pb e 0,0275 µg g ⁻¹ para Ni
Grãos de cacau, casca, solo e balas de chocolate ⁵⁴	Pb	Não há especificação da quantidade de amostra usada. Como reagente, foi utilizado água régia HNO ₃ + HCl (3 mL + 1 mL)	HR-ICP-MS ^d	Os autores observaram que a concentração de Pb em grãos de cacau foi menor ou igual a 0,5 ng g ⁻¹ e 230 e 70 ng g ⁻¹ em cacau manufacturado e balas de chocolate, respectivamente

^a Espectrometria de absorção atômica com chama^b Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite^c Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica^d Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado de alta resolução

2.4.2. Decomposição por via úmida em sistema fechado

No emprego de sistemas fechados, a decomposição da amostra é melhorada pelo efeito sinérgico da elevada temperatura e pressão. Este método é mais eficiente do que o procedimento de decomposição por via úmida em sistema aberto já que as perdas por volatilização são evitadas e os valores dos brancos podem ser reduzidos.^{52b}

Na decomposição utilizando a radiação micro-ondas a reação é mais rápida em relação aos sistemas com aquecimento convencional.^{55a} Dessa forma, a principal diferença entre o aquecimento convencional e o aquecimento com radiação micro-ondas está na forma de transferência de energia. No aquecimento condutivo, é necessário primeiro o aquecimento dos frascos, para que depois o calor seja transferido para a solução. Quando um material não transparente às micro-ondas absorve este tipo de radiação, o material pode sofrer um aumento considerável na sua temperatura, devido, principalmente, à interação da radiação com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando os fenômenos da migração iônica e a rotação de dipolos.⁵⁶ Além disso, os equipamentos modernos proporcionam maior segurança, em vista de possuírem sensores capazes de controlar a temperatura e a pressão na mistura durante a decomposição, além do acompanhamento da potência real irradiada.⁵⁷

Na Tabela 6 estão mostrados alguns trabalhos nos quais a decomposição por via úmida em sistema fechado com aquecimento por radiação micro-ondas é aplicada para amostras de chocolate.

Tabela 6. Decomposição por via úmida em sistema fechado com aquecimento por radiação micro-ondas como método de preparo de amostra para chocolate.

Amostra	Analitos	Preparo da amostra	Técnica de determinação	Observações
Chocolate em barra ⁴⁹	Ca, Mg, Na e K	Entre 0,2 e 0,6 g de amostra, 3 mL de HNO ₃ concentrado e 3 mL de água	F AAS	LDs: 12,5 µg g ⁻¹ para Ca, 2,5 µg g ⁻¹ para Mg, 4,15 µg g ⁻¹ para Na e 4,15 µg g ⁻¹ para K
Açúcar, cacau e Chocolate ²⁶	Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb e Zn	1 g de amostra e 9 mL de HNO ₃ concentrado	F AAS	A concentração de Cd, Co, Cr, Ni, e Pb foi abaixo do LD (< 0,03 µg g ⁻¹ para Cd, < 0,1 µg g ⁻¹ para Co, < 0,2 µg g ⁻¹ para Cr, < 0,2 µg g ⁻¹ para Ni e < 0,1 µg g ⁻¹ para Pb)
Doces a base de chocolate ³⁶	Cd, Co, Cu, Cr, Mn e Zn	2 g de amostra, 9 mL de HNO ₃ concentrado e 1 mL de H ₂ O ₂	ICP-OES	Das 92 amostras avaliadas, Pb foi detectado em altas concentrações em 10 amostras e Cr foi detectado em concentrações elevadas em 7 amostras quando comparado com valores de ingestão máxima tolerável.
Chocolate em barra ⁵⁸	Ag, Ba, Fe, Ga, Ge, Sn, Sr, Te e V	Entre 0,2 e 0,6 g de amostra, 3 mL de água ultra pura e 3 mL de HNO ₃ concentrado	ICP-MS	LDs: 0,042 µg g ⁻¹ para Ag, 0,045 µg g ⁻¹ para Ba, 0,043 µg g ⁻¹ para Fe, 0,001 µg g ⁻¹ para Ga, 0,0015 µg g ⁻¹ para Ge, 0,0015 µg g ⁻¹ para Sn, 0,0065 µg g ⁻¹ para Sr, 0,001 µg g ⁻¹ para Te e 0,01 µg g ⁻¹ para V
Chocolate em barra ²⁷	Co, Cr, Cu, Li, Mn, Mo, Ni, Se e Zn	Entre 0,2 e 0,6 g de amostra, 3 mL de água ultra pura e 3 mL de HNO ₃ concentrado	ICP-MS	Os autores constataram que nas amostras de chocolate analisadas foram encontrados concentrações elevadas de Co, Cu, Cr, Mn e Ni quando comparados com valores de ingestão máxima tolerável
Chocolate em barra ⁵⁹	Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, V e Zn	Entre 0,10 e 0,25 g de amostra, 4 mL de HNO ₃ 2,8 mol L ⁻¹ e 2 mL de H ₂ O ₂	ICP-MS	LDs: 0,035 µg g ⁻¹ para Al, 0,005 µg g ⁻¹ para As, 0,0002 µg g ⁻¹ para Cd, 0,0005 µg g ⁻¹ para Co, 0,010 µg g ⁻¹ para Cr, 0,016 µg g ⁻¹ para Cu, 0,060 µg g ⁻¹ para Mg, 0,005 µg g ⁻¹ para Mn, 0,001 µg g ⁻¹ para Mo, 0,007 µg g ⁻¹ para Ni, 0,004 µg g ⁻¹ para Pb, 0,020 µg g ⁻¹ para Se, 0,012 µg g ⁻¹ para Sr, 0,005 µg g ⁻¹ para V e 0,030 µg g ⁻¹ para Zn
Chocolate em barra ⁶⁰	Br, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti e Zn	0,5 g de amostra, 5 mL de HNO ₃ concentrado, 1 mL de H ₂ O ₂ e 1 mL de HCl concentrado	XRF ^a	LDs: 0,02 µg g ⁻¹ para Br, 0,06 µg g ⁻¹ para Cr, 0,03 µg g ⁻¹ para Cu, 0,04 µg g ⁻¹ para Fe, 0,04 µg g ⁻¹ para Mn, 0,06 µg g ⁻¹ para Ni, 0,03 µg g ⁻¹ para Pb, 0,02 µg g ⁻¹ para Rb, 0,02 µg g ⁻¹ para Sr, 0,05 µg g ⁻¹ para Ti e 0,03 µg g ⁻¹ para Zn

^a Fluorescência de raios X

Uma vez que os procedimentos de decomposição por via úmida foram abordados, a seguir, serão apresentados os aspectos relacionados à decomposição por combustão por via seca e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) em sistema fechado.

2.4.3. Combustão

As reações de combustão apresentam uma eficiência mais elevada no que se refere à conversão de carbono e hidrogênio presentes na matriz para os produtos de oxidação correspondentes. Nesta perspectiva, a combustão em sistemas abertos ou fechados, representa um modo conveniente e efetivo para obter digeridos, contendo o mínimo teor de carbono residual que, conseqüentemente, quando em níveis elevados, pode causar problemas na determinação do analito.¹²

A fonte de oxigênio pode ser o ar, através do preenchimento do frasco de decomposição com oxigênio ou pela passagem de oxigênio por este. Portanto, a grande vantagem deste procedimento é utilizar apenas oxigênio, uma vez que este gás apresenta mínimos teores de elementos traço em relação aos ácidos normalmente empregados.^{44b} Neste procedimento, a matéria orgânica é decomposta por uma combinação de processos envolvendo, principalmente, pirólise e oxidação.

2.4.3.1. Combustão por via seca

Neste sistema, a amostra é aquecida a altas temperaturas em um forno mufla. O oxigênio presente na atmosfera pode atuar como agente oxidante e o resíduo da queima consiste em óxidos de metais, assim como sulfatos não voláteis, silicatos, entre outros constituintes.^{55b} Um dos inconvenientes associados a este método é que elementos que podem ser convertidos em uma forma volátil são geralmente perdidos durante a decomposição. Outro problema que pode estar associado a este método é a ocorrência de reação entre o analito e o material do cadinho, sendo que o analito pode ficar adsorvido nas paredes do recipiente. Além disso, pode haver perda da amostra por projeção ou ignição se o aumento da temperatura for efetuado rapidamente.¹¹

Assim, Guldás²⁹ procedeu a decomposição de amostras de chocolate utilizando a combustão por via seca para posterior determinação de Fe, Cu e Zn por F AAS e Cd, Ni e Pb por GF AAS. Para isso, 1 a 5 g de amostra foram pesadas em cadinho e submetidas a aquecimento em forno mufla (500 ± 25 °C). Após resfriamento, 1 mL de HNO₃ e 10 mL de água foram adicionados ao material. As amostras foram submetidas ainda a decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional e MAWD. Segundo o autor, quando a combustão por via seca e a decomposição por via úmida em sistema aberto foram comparadas, diferenças significativas foram observadas para Cu, Zn e Ni. Além disso, diferenças significativas foram observadas com todos os elementos avaliados quando comparando os métodos de combustão por via seca e MAWD.

No entanto, na decomposição de chocolate para posterior determinação de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Pb por F AAS, Duran *et al.*⁵¹ não encontraram diferenças significativas entre os resultados quando comparando os métodos de combustão por via seca e decomposição por via úmida em sistema aberto. Para a decomposição, 1 g de amostra foi pesada em cadinho de porcelana e a temperatura do forno foi programada para aquecimento gradativo até 450 °C por 1 h e, posteriormente, as amostras foram dissolvidas em 5 mL de HNO₃ (25% v/v). Os LDs não foram informados pelos autores.

2.4.3.2. Combustão em sistema fechado

Dois métodos são classicamente descritos utilizando a combustão em sistema fechado: frasco de combustão de Schöniger e bomba de combustão. Não obstante, a utilização das mesmas decresceu nos últimos anos em função do desenvolvimento de sistemas empregando radiação micro-ondas que, devido às vantagens agregadas, pode ser considerada como uma ferramenta promissora na decomposição por combustão em sistemas fechados.⁶¹

2.4.3.2.1. Combustão iniciada por micro-ondas

Um dos focos principais no desenvolvimento da decomposição de amostras por combustão iniciada por micro-ondas foi associar as vantagens da decomposição por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas e da combustão em sistemas fechados, como a bomba de combustão e o frasco de combustão. No método de MIC, ocorre absorção dos gases em uma solução apropriada e, para assegurar uma boa recuperação dos analitos, pode-se utilizar uma etapa de refluxo.¹²

Assim, um forno de micro-ondas (*Multiwave 3000*[®], Anton Paar GmbH, Graz, Áustria) foi adaptado sem necessidade de modificações do sistema original. Desta forma, frascos de quartzo, bem como um sistema de controle de pressão e temperatura são utilizados. Adicionalmente, um dispositivo de quartzo é inserido no interior do frasco de decomposição, o qual serve tanto como suporte para a amostra, quanto para a proteção da capa de politetrafluoretileno (PTFE).¹²

O método de combustão iniciada por micro-ondas foi desenvolvido por Barin⁶² para a determinação de metais e não metais em produtos farmacêuticos. Neste trabalho foi desenvolvido um suporte de quartzo (posicionado na tampa do frasco) servindo tanto como suporte para a amostra quanto como para a proteção da tampa do frasco. Cerca de 150 mg de estearato de magnésio eram envolvidas em cápsulas feitas manualmente com papel de cigarro gomado e, após, eram adicionados 45 µL de solução de NH_4NO_3 6 mol L⁻¹ (utilizado como iniciador de combustão) na cápsula contendo a amostra. A seguir, eram adicionados 5 mL de HNO_3 concentrado no interior do frasco para absorver os produtos gerados na combustão. O suporte de quartzo, juntamente com a amostra e o papel, eram inseridos em um frasco e pressurizado com cerca de 5 atm de oxigênio. Em seguida, o frasco foi posicionado no interior da cavidade do forno de micro-ondas e submetido ao programa de aquecimento (800 W durante 40 s). Neste trabalho⁶² foi avaliada a eficiência da aplicação de uma etapa de refluxo para garantir a recuperação quantitativa dos analitos. Para a determinação de Co, Cu, Na e Se, por exemplo, somente a etapa de combustão foi necessária e, para Mn e Zn, uma etapa de refluxo foi aplicada para garantir uma melhor recuperação destes elementos. A determinação dos analitos foi feita por F AAS. Os resultados obtidos apresentaram concordância entre 95 e 107% para material de referência certificado (CRM), quando foi feita a combustão com

refluxo, mostrando a eficiência do sistema de decomposição. Segundo o autor, o teor de carbono residual (RCC) foi de, aproximadamente, 0,8%.

Mesko⁶³ propôs a combustão iniciada por micro-ondas para a determinação de Cu e Zn por F AAS em leite em pó e fígado bovino. Foi feita uma comparação do procedimento proposto com outros procedimentos de decomposição utilizados para amostras biológicas (decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional e em sistema fechado com aquecimento por radiação micro-ondas). As amostras foram prensadas na forma de comprimido e colocadas sobre um disco de papel, com 50 μL de solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} , e posicionadas na base de um suporte de quartzo. Foram avaliados três tipos de suporte de quartzo e o suporte mais adequado foi o que ficava suspenso na parte superior do frasco. Após a adição da solução absorvedora no interior do frasco, o sistema era pressurizado a 20 bar com oxigênio e levado ao interior da cavidade do forno de micro-ondas. A recuperação dos analitos foi entre 95 e 104% para Zn quando empregada somente a combustão ou a combustão com refluxo, respectivamente. Para Cu, foram obtidas recuperações entre 93 e 96% para a combustão com e sem refluxo, respectivamente. Os teores de carbono residual foram inferiores a 0,4%.

Para a decomposição de elastômeros, Moraes⁶⁴ utilizou as amostras na forma de comprimido e posicionou-as no suporte de quartzo previamente desenvolvido.⁶⁴ Após a decomposição, foi determinada a concentração de Al, Fe, Mn, Sr e Zn por ICP-OES. A influência da solução absorvedora (água ou ácido nítrico) foi investigada, bem como a necessidade de aplicação da etapa adicional de refluxo. Quando utilizado HNO_3 4 mol L^{-1} ou concentrado como solução absorvedora as recuperações ficaram entre 97 e 101% para todos os elementos estudados, utilizando uma etapa de refluxo. Contudo, foi observado que pelo método oficial para a determinação destes metais neste tipo de amostra as recuperações foram de 14, 37, 72 e 37% para Al, Fe, Mn e Sr, respectivamente. O procedimento permitiu a decomposição de até 500 mg de amostra com teor de RCC inferior a 0,5%. Além disso, o tempo para decomposição foi cerca de 3 vezes menor por MIC em comparação com os outros procedimentos avaliados (decomposição por via seca e decomposição por via úmida com HNO_3 em sistema fechado).

Duarte *et al.*⁶⁵ propuseram a utilização da combustão iniciada por micro-ondas para a decomposição de frutos do mar para a posterior determinação de arsênio

total por ICP-MS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e injeção em fluxo (FI-HG AAS) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de hidretos e injeção em fluxo (FI-HG-ICP-MS). A combustão foi feita em frascos fechados sob atmosfera de oxigênio e foi possível digerir até 500 mg de tecido de frutos do mar. O uso de uma etapa de refluxo e água ou HNO_3 como solução absorvedora foi investigado. A concordância dos valores usando CRM foi entre 96 e 101% usando HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como solução absorvedora e 5 minutos de refluxo. Foi observada uma concordância dos resultados para As maior que 98% nas determinações por FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS quando comparada com os valores por ICP-MS após o procedimento de decomposição. Além disso, o teor de RCC foi menor que 0,5%.

A combustão iniciada por micro-ondas para determinação de impurezas inorgânicas em produtos farmacêuticos foi proposta por Nam *et al.*⁶⁶ para determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V por ICP-MS. Para a decomposição, entre 400 e 700 mg de amostra foram homogeneizadas em pequenos pedaços usando almofariz e pistilo, envoltas em papel filtro e colocadas dentro do frasco de quartzo. Foi utilizado NH_4NO_3 $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ como iniciador de combustão e 5 mL de HNO_3 20% (v/v) como solução absorvedora. Ensaio de recuperação foram realizados para verificar se ocorriam perdas dos analitos durante a etapa de decomposição. Assim, foram observadas recuperações na faixa de 95 a 105% e os LDs para a maioria dos analitos ficaram na faixa de $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$. Os baixos LDs alcançados foram atribuídos aos baixos valores dos brancos e o pequeno fator de diluição envolvido na análise.

Recentemente, Müller *et al.*⁶⁷ utilizaram a combustão iniciada por micro-ondas como método de preparo de amostra para sementes oleaginosas e posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS e Hg por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vapor frio e injeção em fluxo (FI-CV-ICP-MS). As amostras foram envoltas em filme de polietileno e submetidas à combustão usando 20 bar de oxigênio e 6 mol L^{-1} de NH_4NO_3 como iniciador. Massas de amostras de até 500 mg foram digeridas usando 7 mol L^{-1} de HNO_3 como solução absorvedora. A exatidão foi avaliada usando CRM e concordâncias maiores que 96% foram obtidas para todos os analitos. Usando MIC foi possível obter LDs mais baixos quando comparados com a MAWD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os equipamentos, reagentes e a amostra utilizada nos procedimentos de preparo de amostra e na determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES. Também serão descritos os métodos de decomposição por via seca, decomposição por via úmida em sistema aberto usando bloco digestor, MAWD, SRC MAWD e MIC.

3.1. Instrumentação

A amostra de chocolate foi submetida à decomposição por via seca, decomposição por via úmida em sistema aberto usando bloco digestor, MAWD, SRC MAWD e MIC. Os equipamentos utilizados nestes métodos serão descritos a seguir.

Para a decomposição por MIC e MWAD foi utilizado um forno de micro-ondas (Multiwave 3000, *Microwave Sample Preparation System*, Anton Paar, Áustria) equipado com oito frascos de quartzo, com capacidade individual de 80 mL. O fabricante recomenda pressão, temperatura e potência máxima de 80 bar, 280 °C e 1400 W, respectivamente. Além disso, há a possibilidade do monitoramento da temperatura e pressão utilizados pelo fato deste equipamento ser operado com sensores para tal propósito.

Na decomposição das amostras de chocolate por via seca, foram utilizados cadinhos de platina com diâmetro de 4 cm (capacidade para 50 mL) e espessura de 1 mm. O procedimento de decomposição foi feito em um forno mufla (modelo 0913, Jung, Brasil) que possui capacidade de 9 L e opera com temperatura máxima de 1300 °C. Para a decomposição em sistema aberto foi utilizado um bloco digestor (modelo DK 42, Velp Scientifica, Itália) com controle da temperatura e tempo de aquecimento.

Neste trabalho foi feita a decomposição da amostra de chocolate por via úmida assistida por radiação micro-ondas empregando o sistema baseado em câmara única de reação (Ultrawave SRC, *Microwave Digestion System*, Milestone, Itália). O sistema é equipado com uma câmara de reação de aço inoxidável, revestida com um recipiente de PTFE com capacidade de 1 L, que permite utilizar simultaneamente até 15 frascos de decomposição, com capacidade individual de 15 mL. Este equipamento opera com sensores que monitoram a temperatura e a pressão na câmara de reação durante a decomposição da amostra. As condições máximas de pressão, temperatura e potência de operação recomendadas pelo fabricante são de 199 bar, 300 °C e 1500 W, respectivamente.

A determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb nos digeridos foi feita por ICP-OES (Optima 4300 DV, PerkinElmer, EUA), utilizando a vista axial. O equipamento é equipado com nebulizador concêntrico de quartzo (Meinhard tipo A, Golden, EUA), câmara de nebulização ciclônica de vidro (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Austrália) com tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Austrália)

com tubo injetor (2,5 mm d.i.). As linhas de emissão selecionadas foram Cd 228,802 nm, Co 238,892 nm, Cr 262,716 nm, Ni 231,604 nm e Pb 220,353 nm. Este equipamento também foi utilizado para a determinação de carbono residual nas soluções finais obtidas pelos diferentes métodos de preparo de amostra segundo adaptação do procedimento descrito por Gouveia *et al.*⁶⁸ Neste procedimento foi selecionada a linha de emissão do C 193,030 nm.

Além da nebulização pneumática foi utilizado um nebulizador ultrassônico (modelo *U-6000AT+*, CETAC Technologies, USA) nas determinações por ICP-OES. Neste nebulizador, a amostra é bombeada e inserida, através de um capilar, diretamente na superfície de um cristal piezoelétrico. As ondas de ultrassom geradas pelo transdutor se propagam na direção longitudinal e atingem a superfície do líquido, que por sua vez, é separado em gotículas muito pequenas, formando um aerossol.⁶⁹ O nebulizador ultrassônico possui um estágio de dessolvatação, o qual é efetuado pelo aquecimento e resfriamento sucessivos da amostra através de um tubo em U e de um condensador, respectivamente. Na Tabela 7 estão mostradas as condições recomendadas pelo fabricante⁷⁰ bem como a faixa que pode ser variada para cada parâmetro.

Tabela 7. Condições de operações recomendadas e faixas para análises de amostras aquosas sem a membrana de dessolvatação para USN-ICP-OES (adaptado de Cetac Technologies⁷⁰).

	Condições recomendadas	Faixa
Potência do gerador de rádio frequência (W)	1200	800-1500
Gás do plasma (L min ⁻¹)	15	12-20
Gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5	0,2-0,7
Gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7	0,3-1,5
Vazão da bomba (mL min ⁻¹)	2,5	1,0-3,0
Temperatura do tubo em U (°C)	140	120-160
Temperatura do condensador (°C)	3	(-5) – (+10)

Além disso, a determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb também foi feita por ICP-MS (modelo ELAN DRC II, PerkinElmer-SCIEX, EUA) utilizando nebulizador concêntrico de quartzo (Meinhard tipo A, Golden, EUA), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Austrália) e com uma tocha de

quartzo (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Austrália) com tubo injetor (2 mm d.i.). Os isótopos monitorados para a determinação foram Cd 111, Co 59, Cr 53, Ni 58 e Pb 208.

Na Tabela 8, estão mostradas as condições operacionais utilizadas para a determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por PN-ICP-OES e ICP-MS.

Tabela 8. Condições operacionais para a determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por PN-ICP-OES e ICP-MS.

Parâmetros	PN-ICP-OES	ICP-MS
Potência do gerador de rádio frequência (W)	1400	1400
Vazão do gás principal (Ar, L min ⁻¹)	15	15
Vazão do gás auxiliar (Ar, L min ⁻¹)	0,2	1,2
Vazão do gás de nebulização (Ar, L min ⁻¹)	0,7	1,08
Câmara de nebulização	Ciclônica	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico	Concêntrico
Vista	Axial	-
Analitos	Linha de emissão (nm)	(m/z)
Cd	228,802 (I)	111
Co	238,892 (II)	59
Cr	267,716 (II)	53
Ni	231,604 (II)	58
Pb	220,353 (II)	208

* (I) linha de emissão atômica e (II) linha de emissão iônica

Todos os procedimentos de pesagem foram feitos utilizando uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu do Brasil, Brasil) com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. A cominuição das amostras foi feita utilizando um moedor criogênico Spex Certi Prep (modelo 6750, Metuchen, EUA).

3.2. Programas computacionais

Para a confecção dos gráficos foram utilizados os *softwares* Origin (Microcal Software, Inc., versão 6.0, 2008) e Excel (Microsoft Corporation, versão 14.0, 2010). Nos processamentos das informações, empregou-se a estatística descritiva para a tabulação dos dados e sua ilustração gráfica, através de histogramas para a visualização e interpretação das medidas de tendência central e de dispersão. Desta

forma, para a comparação dos resultados finais obtidos pelas metodologias avaliadas neste estudo e às de referência utilizou-se as provas estatísticas não paramétrica de Mann Whitney e Kruskal Wallis, com nível de significância de 95%, utilizando o *software* GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc., versão 3.0, 2003).

3.3. Reagentes

A água utilizada neste trabalho foi destilada, desionizada numa coluna de troca iônica e purificada em um sistema Milli-Q (Milli-Q *Ultrapure Water Purification Systems, Gradient System, Millipore*, EUA), apresentando resistividade final de 18,2 MΩ cm. Os ácidos, nítrico concentrado P.A. (65%, 1,4 kg L⁻¹, Merck, Alemanha) e clorídrico concentrado P.A. (37%, 1,19 kg L⁻¹, Merck, Alemanha), utilizados nos procedimentos de decomposição das amostras e no preparo de soluções, foram destilados abaixo de seu ponto de ebulição em sistema de quartzo (duoPUR, *Subboiling Distillation System*, Milestone, Itália). Peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Brasil) foi utilizado como um dos reagentes na decomposição por MAWD. Além disso, na decomposição por MIC, foi preparada uma solução de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹ como iniciador de combustão (ACS, Merck, Brasil).

As soluções de referência utilizadas para a calibração dos instrumentos de ICP-OES e ICP-MS foram preparadas a partir de uma solução de referência multielementar SCP33MS, com concentração de 10 mg L⁻¹ (SCP Science, Canadá) de cada analito. As soluções de referência utilizadas para determinação de carbono residual por ICP-OES foram preparadas a partir de sucessivas diluições de uma solução estoque de carbono, feita pela dissolução de C₆H₈O₇ (Vetec, Brasil) em água purificada. A determinação do teor de carbono residual foi feita utilizando a adição de ítrio a partir de uma solução de 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 0,28 mol L⁻¹, (Spex CertiPrep®, Metuchen, EUA) como padrão interno.

Argônio, com pureza de 99,998% (White Martins, Brasil) foi utilizado para formação do plasma, gás de nebulização e gás auxiliar nas determinações feitas por ICP-OES e ICP-MS. Oxigênio, com pureza de 99,6% (White Martins, Brasil) foi utilizado para pressurização dos frascos no método de decomposição por MIC.

3.4. Amostras e materiais de referência certificados

A amostra de chocolate foi adquirida em um supermercado local, a qual foi armazenada sob refrigeração. Para os diferentes métodos de decomposição, foi utilizada uma barra de chocolate Nestlé (meio amargo) de 170 g. De acordo com as especificações do fabricante a data de validade do produto é 09/03/14 e o número do lote é 32821211. Os ingredientes que fazem parte da constituição deste chocolate são açúcar, cacau, leite em pó integral, gordura vegetal, emulsificante lecitina de soja e monooleato de glicerila e aromatizante. Na Tabela 9 estão mostradas as informações nutricionais do chocolate utilizado neste trabalho.

Tabela 9. Informações nutricionais do chocolate.

Componente	Teor (%)
Carboidratos	56
Proteínas	5,6
Gorduras totais	28,4
Gorduras saturadas	15,6
Fibra alimentar	6,4

Os CRMs usados foram leite em pó integral NIST 8435 (*whole milk powder*, USA) e leite em pó sem gordura NIST 1549 (*non-fat milk*, USA).

Na Figura 1 estão mostradas as etapas dos métodos de decomposição utilizados neste trabalho e os parâmetros avaliados por MIC e USN-ICP-OES.

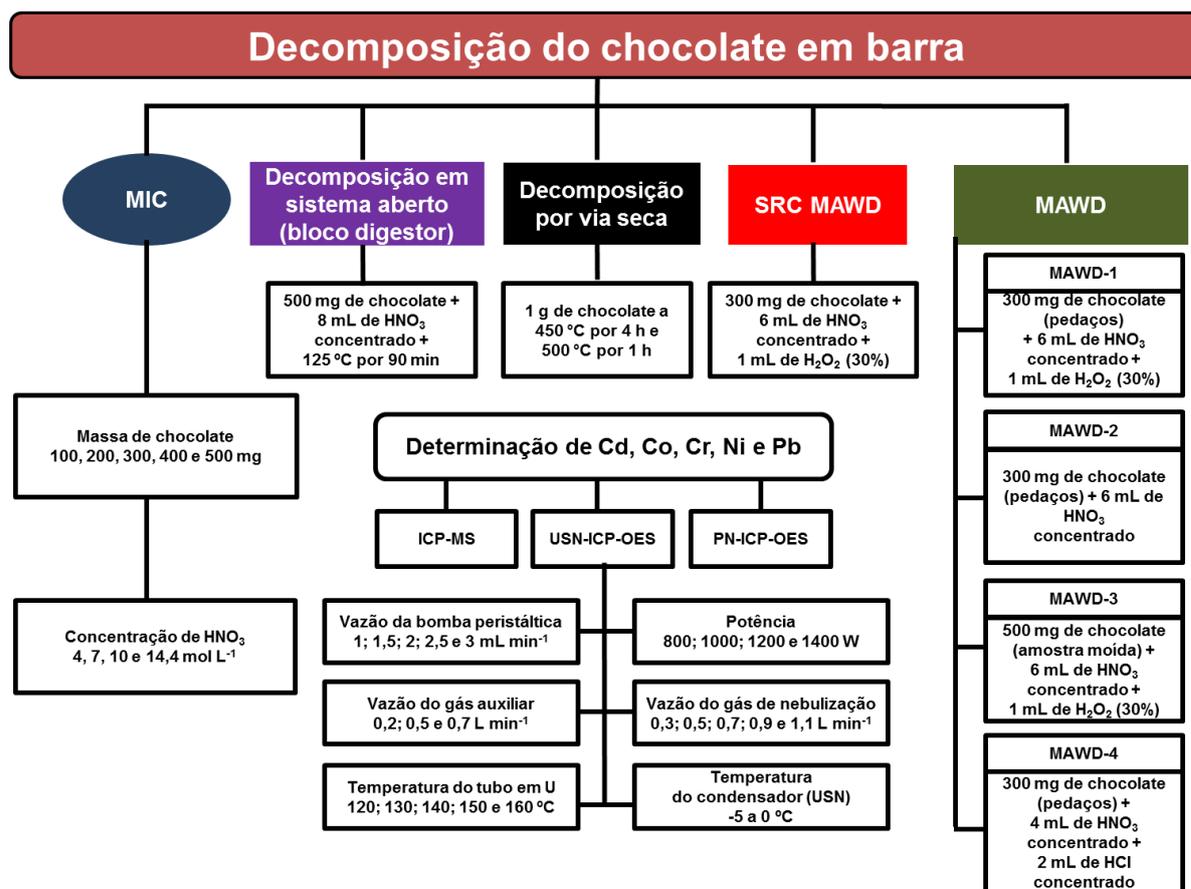


Figura 1. Etapa de avaliação dos métodos de decomposição do chocolate.

3.5. Decomposição por via seca

A amostra de chocolate foi decomposta por via seca seguindo recomendações do Instituto Adolfo Lutz.⁷¹ Neste procedimento, 1 g de amostra foi pesado em cadinho de platina e a temperatura da mufla foi programada para aquecimento a $7\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $450\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta temperatura foi mantida por 4 h e, após, a temperatura foi aumentada para $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, na mesma taxa de aquecimento, permanecendo nesta temperatura por 1 h. Após resfriamento, o resíduo foi dissolvido em 6 mL de HNO_3 concentrado e aferido até 30 mL. A determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb foi feita por PN-ICP-OES e ICP-MS. Cabe destacar que nas determinações por ICP-MS foi efetuada uma diluição por um fator de 4 vezes.

3.6. Decomposição por via úmida em sistema aberto utilizando bloco digestor

Na decomposição do chocolate por via úmida utilizando bloco digestor, segundo adaptação do procedimento de Duran *et al.*⁵¹, aproximadamente 500 mg de amostra foram transferidos para os tubos de decomposição, seguido da adição de 8 mL de HNO₃ concentrado. O programa de aquecimento consistiu de 60 °C por 20 min, 80 °C por 20 min, 125 °C por 90 min e 140 °C por 60 min.

3.7. Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas

Para a decomposição do chocolate por MAWD (sistema Multiwave, Anton Paar), adaptação de Noel *et al.*²⁷, foram cortados pequenos pedaços de chocolate utilizando espátula e transferidos 300 mg de amostra para o frasco de decomposição juntamente com 6 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ (30%). Este procedimento foi denominado de MAWD-1. Adicionalmente, foi efetuado o mesmo procedimento anterior porém sem adição de H₂O₂ o qual foi denominado de MAWD-2. Posteriormente, foi avaliado o uso de 500 mg de amostra cominuída em moinho criogênico e adicionados ao frasco de decomposição juntamente com 6 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ (30%). Este procedimento foi denominado de MAWD-3. Por fim, foi efetuado um procedimento onde foram cortados pequenos pedaços do chocolate utilizando espátula e transferidos 300 mg de amostra para o frasco de decomposição juntamente com uma mistura de 4 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de HCl concentrado e este procedimento foi denominado MAWD-4. Em todos os procedimentos descritos anteriormente, os frascos foram fechados, fixados no rotor e submetidos ao programa de aquecimento que consistiu de (i) 1400 W (com rampa de 10 min), (ii) 1400 W por 20 min e (iii) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Após o programa de aquecimento, as soluções foram transferidas para os frascos de polipropileno e aferidas a 30 mL para a posterior determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por PN-ICP-OES e ICP-MS.

3.8. Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação

No procedimento SRC MAWD (sistema Ultrawave, Milestone), foram cortados pequenos pedaços do chocolate com espátula e transferidos 300 mg de amostra para o frasco de quartzo juntamente com 6 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ (30%). Em seguida, os frascos foram posicionados no rotor, o qual foi fixado no equipamento e introduzido automaticamente na cavidade. A cavidade foi fechada e pressurizada com 40 bar de argônio. O programa de aquecimento utilizado consistiu de (i) 1500 W por 10 min e (ii) 1500 W por 20 min. Após a etapa de resfriamento, a solução final foi coletada e o frasco aferido a 30 mL com água purificada. A determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb nas soluções resultantes foi feita por PN-ICP-OES e ICP-MS.

3.9. Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas

Para a decomposição das amostras de chocolate empregando MIC (sistema Multiwave, Anton Paar), segundo procedimento descrito por Barin *et al.*¹², foram cortados pequenos pedaços do chocolate utilizando espátula. A amostra foi posicionada sobre a base do suporte de quartzo contendo um disco de papel filtro umedecido com 50 µL de uma solução de NH₄NO₃ (6 mol L⁻¹). Em seguida, o suporte foi inserido no frasco de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora. Após, os frascos foram fechados, fixados no rotor e pressurizados com 20 bar de O₂ durante 1 min. Posteriormente, o rotor, com os frascos pressurizados, foi colocado no interior do forno de micro-ondas e o programa de aquecimento consistiu de (i) 1400 W por 5 min e (ii) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Após o término do programa de aquecimento, as soluções obtidas foram coletadas e aferidas com água purificada até 30 mL. As determinações de Cd, Co, Cr, Ni e Pb foram feitas por PN-ICP-OES e ICP-MS.

Para a decomposição por MIC, inicialmente, foi feito um estudo da massa de amostra de chocolate que poderia ser utilizada, propiciando uma condição segura de utilização do forno de micro-ondas. Para tanto, atentando para o fato do pico de pressão ser pelo menos 50% inferior a pressão máxima de trabalho (80 bar), foram

avaliadas massas de 100, 200, 300, 400 e 500 mg de amostra. Após, foram avaliadas diferentes concentrações de HNO_3 (4, 7, 10 e 14,4 mol L^{-1}) utilizando a massa de amostra avaliada como segura.

A eficiência dos métodos de decomposição do chocolate foi avaliada pela determinação de RCC nas soluções finais. Para a determinação de RCC por ICP-OES, foi utilizado ítrio como padrão interno, na concentração final de 1 mg L^{-1} . O branco, as soluções de referência utilizadas na calibração e as amostras foram purgadas com argônio durante 2 minutos antes da determinação, para a remoção do CO_2 dissolvido.

3.10. Determinação por ICP-OES utilizando nebulização ultrassônica

Foi feito um estudo dos parâmetros do nebulizador ultrassônico para a determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-OES. Assim, foram avaliadas a vazão da bomba peristáltica, potência do gerador de rádio frequência, vazão do gás auxiliar, vazão do gás de nebulização, temperatura de aquecimento do tubo em U e temperatura de resfriamento do condensador.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos por ICP-MS e PN-ICP-OES para Cd, Co, Cr, Ni e Pb após a decomposição do chocolate por via seca, decomposição por via úmida utilizando bloco digestor, MAWD e SRC MAWD. Após, são discutidos os resultados obtidos para as condições avaliadas por MIC: massa de amostra e concentração de HNO₃. Posteriormente, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as condições avaliadas do nebulizador ultrassônico: vazão da bomba peristáltica, potência do gerador de rádio frequência, vazão do gás auxiliar, vazão do gás de nebulização, temperatura de aquecimento do tubo em U e temperatura de resfriamento do condensador. Em seguida os resultados obtidos por USN-ICP-OES são comparados e discutidos.

4.1. Avaliação dos métodos de decomposição de chocolate

Após a decomposição por via seca as soluções resultantes apresentaram teores de RCC de $0,04 \pm 0,01\%$. Os resultados obtidos para Cd, Co, Cr, Ni e Pb após a decomposição do chocolate por via seca e posterior determinação por ICP-MS estão mostrados na Figura 2.

Após a decomposição do chocolate por via úmida em sistema aberto foi observada a formação de um resíduo sólido esbranquiçado em suspensão, provavelmente gordura não decomposta, e alguns aderidos a parede do frasco de polipropileno. Os resultados obtidos para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS estão mostrados na Figura 2. As soluções resultantes da decomposição da amostra de chocolate utilizando bloco digestor apresentaram RCC de $14,1 \pm 0,1\%$.

Na decomposição do chocolate por MAWD foram feitas quatro avaliações. As soluções resultantes da decomposição pelos procedimentos MAWD-1, MAWD-2, MAWD-3 e MAWD-4 apresentaram RCC entre 1,2 e 1,4%. Para avaliação da exatidão do método de MAWD-2 foi feita a decomposição de dois CRMs. O método MAWD-2 foi adotado como referência, pois se procurou trabalhar com um valor de massa de chocolate intermediário normalmente adotado em alguns trabalhos da literatura^{27,49,58,59} (em torno de 300 mg). Neste método foi utilizado apenas HNO₃ concentrado, como condição inicial, a fim de se avaliar a necessidade de utilização de uma mistura de reagentes para uma decomposição efetiva do chocolate. Os resultados obtidos para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS após os diferentes procedimentos de MAWD estão mostrados na Figura 2 e os resultados para os CRMs estão mostrados na Tabela 10.

Na decomposição por SRC MAWD, 300 mg de amostra, cortadas em pequenos pedaços, foram transferidos para um frasco de quartzo com 6 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ (30%). O programa de aquecimento foi utilizado conforme orientações do fabricante do equipamento. Os resultados obtidos para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS estão mostrados na Figura 2. O teor de RCC foi de $1,2 \pm 0,1\%$.

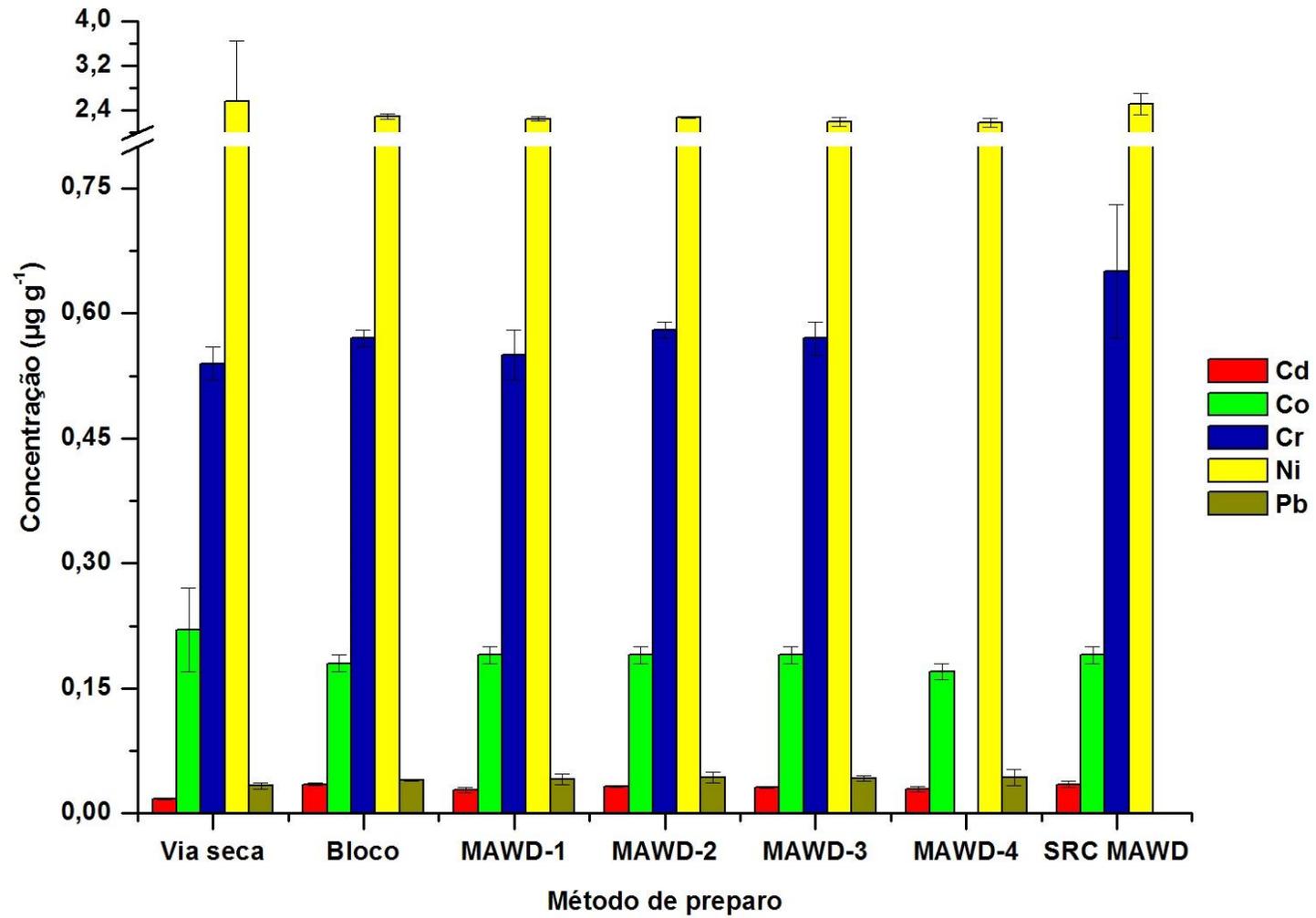


Figura 2. Concentração de Cd, Co, Cr, Ni e Pb na amostra de chocolate após decomposição por via seca, decomposição por via úmida em sistema aberto, MAWD e SRC MAWD e determinação por ICP-MS.

De acordo com a Figura 2, na decomposição por via seca, os resultados obtidos para Co, Cr, Ni, e Pb após determinação por ICP-MS não apresentaram diferença significativa com relação ao procedimento MAWD-2. Entretanto, o valor obtido para Cd após a decomposição por via seca ($0,017 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$) e determinação por ICP-MS apresentou diferença significativa quando comparado com o método MAWD-2 ($0,032 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$). Vale ressaltar que o método de decomposição por MAWD-2 utilizou frasco fechado para a decomposição da amostra, o que evita a perda de analitos por volatilização.

Ao utilizar a decomposição por via seca no preparo de amostras ricas em gordura, como no caso do chocolate, pode ocorrer a rápida ignição da amostra com consequente perda de alguns elementos. Outra questão é que Cd e Co são voláteis como cloretos ou brometos a temperaturas elevadas.⁷² Perdas também podem ocorrer através da retenção dos elementos no recipiente de decomposição e os cadinhos de platina podem formar ligas com metais nobres.⁷³ Cabe ressaltar que por se tratar de um sistema de decomposição aberto, existe a possibilidade de contaminação através do ar atmosférico ou do ambiente interno da mufla e este fato foi observado pois houve problemas de contaminação por Ni o que refletiu em um elevado desvio padrão. Não obstante, foi possível efetuar a decomposição de 1 g de amostra com um teor de RCC de $0,04 \pm 0,01\%$ e foram observados os LDs mais baixos (Tabela A2, em anexo) em comparação aos outros métodos de preparo avaliados. Além disso, este método permite a decomposição de grandes quantidades de amostras com uma elevada frequência de determinações.⁷⁴ Apesar destas vantagens, o tempo de execução do método foi longo (aproximadamente 6 h) o que não seria, de um certo ponto, atrativo para aplicações na indústria do chocolate quando há necessidade de resultados rápidos para, por exemplo, liberação de lotes do produto.

Na decomposição por via úmida em sistema aberto utilizando bloco digestor os resultados para todos os analitos após a determinação por ICP-MS não apresentaram diferença significativa quando comparados com aqueles obtidos por MAWD-2. Contudo, o valor de RCC obtido após a decomposição utilizando bloco digestor foi de $14,1 \pm 0,1\%$.

A decomposição em pressão atmosférica com ácido nítrico apresenta temperatura limitada pelo ponto de ebulição do ácido ou mistura ácida o que pode acarretar na decomposição incompleta da amostra. Para minimizar este problema,

pode-se usar ácido sulfúrico podendo, assim, elevar a eficiência de oxidação. Entretanto, a utilização deste ácido pode causar problemas na etapa de determinação por técnicas de espectrometria atômica.⁷⁵⁻⁷⁷ Além do mais, a introdução de amostras no instrumento de ICP-MS cujas matrizes contenham altas concentrações de carbono residual, ou mesmo solventes orgânicos, levam à perda de sensibilidade, pois pode ocorrer deposição de carbono sobre o cone de amostragem, alterando o processo de extração dos íons do plasma.⁷⁸

A decomposição em sistema aberto permite o processamento de um grande número de amostras, empregando um sistema bastante simples e de baixo custo.⁷⁹ Contudo, na perspectiva de determinação de elementos em baixas concentrações como Cd e Pb por ICP-MS poderia haver um comprometimento da determinação em função de etapas de diluições necessárias para minimizar as interferências (como exemplo, o teor elevado de RCC) e, também, podem ocorrer contaminações resultantes da mistura ácida empregada no intuito de obter uma decomposição mais efetiva. Cabe destacar que o tempo de execução do procedimento de decomposição em bloco digestor foi longo (aproximadamente 3,5 h).

Quando foi efetuada a decomposição do chocolate pelos procedimentos MAWD-1 e MAWD-3 não houve diferença significativa entre os resultados após a determinação por ICP-MS para Cd, Co, Cr, Ni e Pb quando comparados com aqueles obtidos por MAWD-2. Na decomposição por MAWD a decomposição da amostra ocorre em elevadas temperaturas devido à elevação do ponto de ebulição do ácido^{44b}, o que oferece uma vantagem frente aos métodos de decomposição por via úmida utilizando bloco digestor. Além disso, como observado no presente trabalho, os tempos de decomposição são mais curtos por MAWD (40 min) quando comparados com os tempos da decomposição por via úmida utilizando bloco digestor e a decomposição por via seca. Vale destacar que com MAWD-3 foi possível a decomposição de 500 mg de amostra o que é interessante na obtenção de LDs mais baixos.

Na decomposição do chocolate utilizando o procedimento MAWD-4, não houve diferença significativa dos resultados após a determinação por ICP-MS para Cd, Co, Ni e Pb quando comparados com aqueles obtidos por MAWD-2. Contudo, não foi possível a determinação de Cr por ICP-MS após a decomposição por este método devido a interferências poliatômicas resultantes ($^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$), pois HCl foi um dos ácidos utilizados na decomposição.

Na decomposição do chocolate utilizando SRC MAWD não houve diferença significativa entre os resultados para Cd, Co, Cr e Ni por ICP-MS quando comparados com os resultados obtidos após a decomposição por MAWD-2. Entretanto, não foi possível efetuar a determinação de Pb por ICP-MS em função de problemas de contaminação.

A decomposição por MAWD-3 foi feita com a amostra moída na forma de pó e foram observadas concordâncias dos resultados para todos os analitos com os outros procedimentos por MAWD após a determinação por ICP-MS. Além disso, a combinação de HNO₃ concentrado e H₂O₂ mostrou-se efetiva para a decomposição de 500 mg de chocolate por MAWD, com concordâncias satisfatórias para Cd, Co, Cr, Ni e Pb. Cabe destacar que Nardi *et al.*⁵⁹ observaram que na decomposição de 100 a 250 mg de chocolate a combinação de 4 mL de HNO₃ 2,8 mol L⁻¹ e 2 mL de H₂O₂ (30%) foi efetiva para a degradação da matéria orgânica. Logo, a decomposição do chocolate pode ser efetuada por MAWD-3 utilizando 500 mg de amostra sem a necessidade de efetuar um procedimento de moagem para posterior determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS.

Com relação aos valores obtidos por PN-ICP-OES, os resultados para Cd, Co (com exceção do resultado para a decomposição por via seca, $0,22 \pm 0,09 \mu\text{g g}^{-1}$) e Pb ficaram abaixo do LD para todos os métodos avaliados (Tabela A2, em anexo). De acordo com a Figura 3 não houve diferença significativa entre os valores obtidos por ICP-MS e PN-ICP-OES para Cr e Ni após decomposição por via seca, bloco, MAWD-1, MAWD-2, MAWD-3 e SCR MAWD. Contudo, no método MAWD-4 não foi possível a determinação de Cr por ICP-MS em função de interferências poliatômicas (o valor obtido por PN-ICP-OES foi de $0,61 \pm 0,03$) e não foi observada diferença significativa entre o valor obtido para Ni por ICP-MS e PN-ICP-OES após decomposição por MAWD-4.

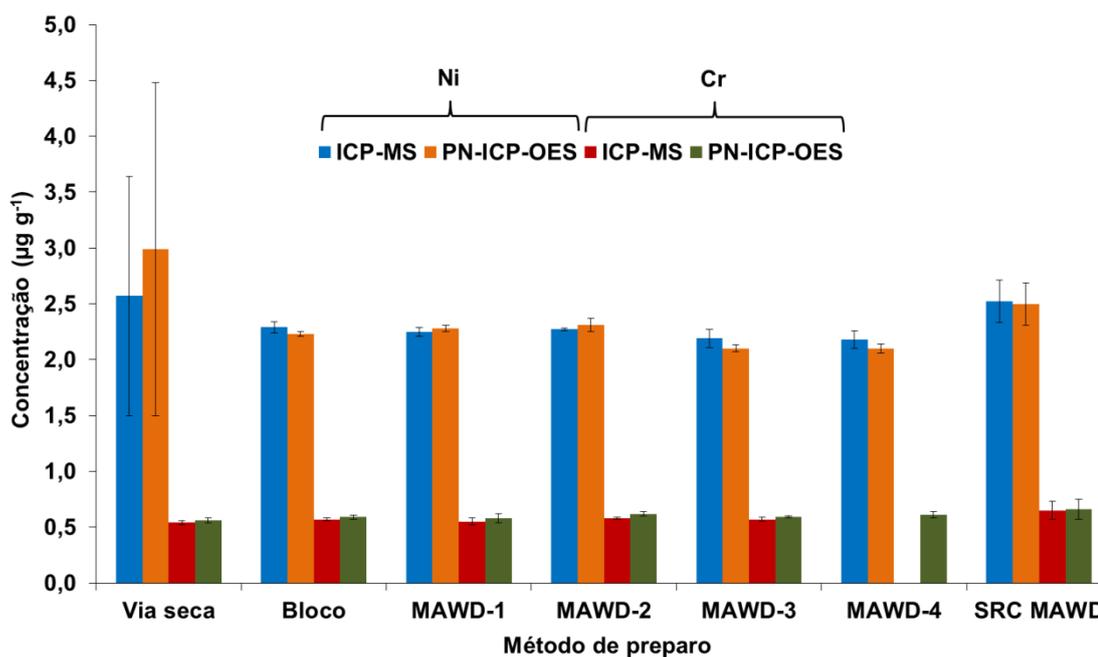


Figura 3. Comparação dos valores obtidos para Cr e Ni por ICP-MS e PN-ICP-OES na amostra de chocolate após decomposição por via seca, decomposição por via úmida em sistema aberto, MAWD e SRC MAWD.

Na decomposição do CRM 1549, de acordo com a Tabela 10, foram observadas concordâncias da ordem de 97 e 95% para Co e Pb, respectivamente, após a determinação por ICP-MS. Contudo, os valores para Cd, Cr e Ni ficaram abaixo do LD por ICP-MS e os valores obtidos por PN-ICP-OES ficaram abaixo do LD para todos os elementos. Com relação aos resultados obtidos para o CRM 8435, foram observadas concordâncias da ordem de 107, 104 e 91% para Co, Cr e Pb, respectivamente, após a determinação por ICP-MS. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para Cr por ICP-MS e PN-ICP-OES e os valores para Cd e Ni ficaram abaixo do LD tanto por ICP-MS como por PN-ICP-OES.

A seguir, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos após a avaliação das condições estudadas na decomposição por MIC. Cabe destacar que os resultados do método MAWD-2 serão adotados como referência para comparação com os valores de MIC.

Tabela 10. Resultados ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos para o CRM 1549 e CRM 8435 pelo método MAWD-2.

	CRM 1549 ^a		CRM 8435 ^b	
	ICP-MS	PN-ICP-OES	ICP-MS	PN-ICP-OES
Cd	<0,0002	<0,06	<0,0002	<0,06
Co	0,0040 \pm 0,0002	<0,06	0,0032 \pm 0,0003	<0,06
Cr	<0,0039	<0,14	0,52 \pm 0,01	0,54 \pm 0,04
Ni	<0,03	<0,22	<0,03	<0,22
Pb	0,018 \pm 0,001	<0,70	0,10 \pm 0,01	<0,70

a: valores certificados para Cd ($0,0005 \pm 0,0002 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($0,0026 \pm 0,0007 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($0,019 \pm 0,003 \mu\text{g g}^{-1}$) e valor informado para Co ($0,0041 \mu\text{g g}^{-1}$). Para Ni não há valor certificado ou informado.

b: valores informados para Cd ($0,0002 \mu\text{g g}^{-1}$), Co ($0,003 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($0,01 \mu\text{g g}^{-1}$) e valor certificado para Pb ($0,11 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$)

4.2. Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas

Foi utilizado o método de MIC para a decomposição de chocolate para a posterior determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS e PN-ICP-OES. Assim, para avaliar as condições experimentais da decomposição das amostras de chocolate por MIC foram utilizadas massas de amostra entre 100 e 500 mg e HNO_3 nas concentrações de 4, 7, 10 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ como solução absorvedora.

Cabe destacar que no decorrer dos experimentos a sequência de adição da amostra foi executada do mesmo modo (item 3.9 *Materiais e Métodos*). Após o programa de aquecimento, foi feita a determinação dos analitos nas soluções resultantes por ICP-MS e por PN-ICP-OES. Os valores obtidos foram comparados com os valores de referência (obtidos pela decomposição por MAWD-2). Em seguida, os teores de RCC nas soluções finais obtidas por MIC foram comparados com os valores obtidos por MAWD-2.

4.2.1. Avaliação da massa de amostra

Primeiramente, foi realizado um estudo a fim de avaliar a massa de amostra que pode ser decomposta no sistema sem riscos operacionais. Assim, a combustão de chocolate foi avaliada, variando a massa de amostra de 100 a 500 mg e mantendo a pressão inicial fixa em 20 bar de oxigênio. Estas condições foram

avaliadas utilizando 50 μL de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} como iniciador de combustão, 6 mL de água como solução absorvedora e 1400 W de irradiação. Os resultados obtidos para a máxima pressão observada em função da massa utilizada estão mostrados na Figura 4.

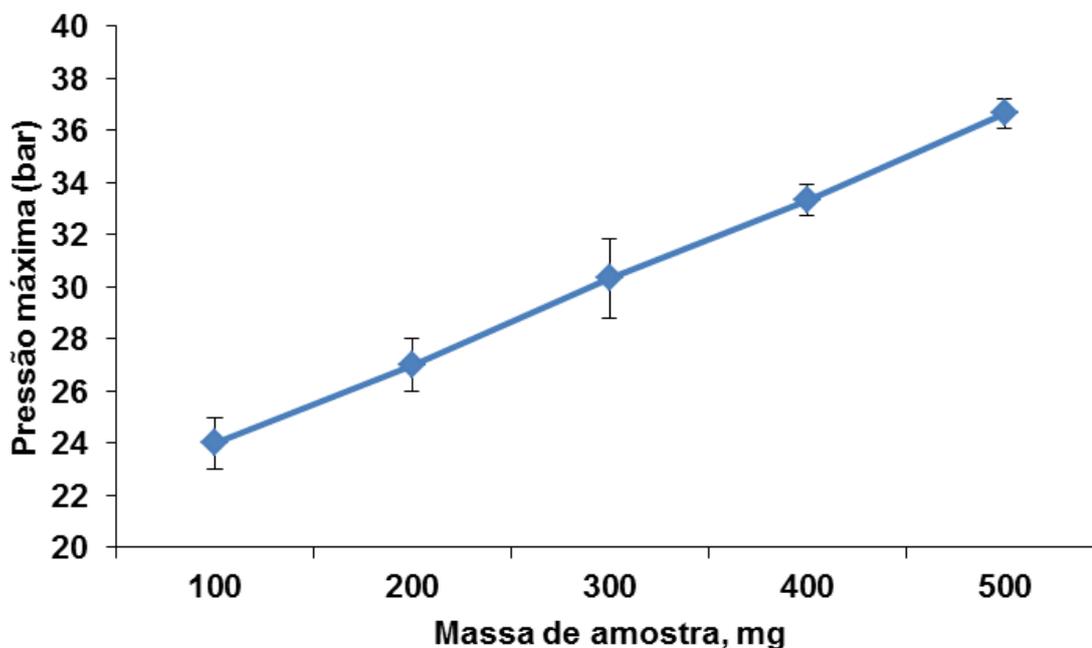


Figura 4. Pressão máxima atingida no sistema em função da massa de chocolate utilizada na decomposição por MIC ($n=3$).

De acordo com a Figura 4, quando 500 mg de amostra foram decompostas, considerando a pressão inicial de 20 bar, a pressão máxima atingida foi cerca de 37 bar. Em função disto, as condições operacionais do sistema foram mantidas uma vez que a pressão máxima atingida é menor que 50% do limite do sistema, que é de 80 bar. Cabe ressaltar que na combustão da amostra de chocolate considerando esta massa não houve a observação de algum tipo de resíduo sólido. Entretanto, a utilização de massas maiores que 500 mg poderiam ocasionar problemas em função da amostra de chocolate queimar rapidamente o que poderia acarretar em eventuais riscos durante a combustão. Portanto, a massa de 500 mg foi escolhida para os testes posteriores.

4.2.2. Avaliação da concentração de HNO₃

De acordo com Mesko *et al.*⁸⁰, ácido nítrico diluído pode ser uma solução absorvedora adequada para o método de MIC para muitos analitos. Além disso, os analitos são retidos em uma solução bem mais compatível para muitas técnicas analíticas instrumentais, notavelmente aquelas baseadas em espectrometria atômica. Sob este aspecto, neste estudo, foram utilizados 500 mg de massa de chocolate para avaliar o uso de soluções de HNO₃ nas concentrações de 4, 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹. Assim, os resultados obtidos para Cd, Co, Cr, Ni e Pb após a decomposição utilizando estas soluções e determinação por ICP-MS estão mostradas na Figura 5.

Conforme a Figura 5, quando utilizado HNO₃ 4 mol L⁻¹ foram observadas diferenças significativas para Co, Cr e Ni após a determinação por ICP-MS e comparação com MAWD-2. Entretanto, não houve diferença significativa dos valores nesta concentração de ácido para Cd e Pb. Logo, há a necessidade de utilização de HNO₃ mais concentrado que 4 mol L⁻¹ para uma melhor recuperação de Co, Cr e Ni.

A escolha da solução absorvedora para reter os analitos depois da combustão é importante para alcançar adequadas recuperações, sendo que a solução deve ser compatível com a técnica de determinação⁶¹. Assim, ácido nítrico diluído tem sido usado e mostrou ser um meio adequado para a absorção de muitos metais.⁸¹ Contudo, no caso de elementos como Co, Cr e Ni presentes no chocolate, é necessária a utilização de maior concentração de ácido.

Em um estudo conduzido por Leggli *et al.*²³, utilizando F AAS, as concentrações encontradas para Ca em diferentes marcas de chocolate foram de 665 ± 31, 692 ± 28, 731 ± 23 e 2069 ± 55 µg g⁻¹. Além disso, no mesmo estudo, as concentrações encontradas para Mg foram de 997 ± 11, 1328 ± 15, 1576 ± 37 e 1834 ± 77 µg g⁻¹. Portanto, o comportamento para a decomposição por MIC observado neste trabalho poderia ser explicado devido à alta concentração de metais alcalinos terrosos como Ca e Mg, presentes no chocolate, que poderiam formar óxidos insolúveis na presença de uma alta concentração de oxigênio e, conseqüentemente, causar a retenção de outros elementos.⁸² Cabe destacar que foi efetuada uma avaliação inicial por PN-ICP-OES de alguns elementos presentes na amostra sob estudo e a concentração de Mg encontrada foi de 1029 ± 27 µg g⁻¹. Além disso, alguns compostos poderiam estar retidos na superfície do suporte de

quartzo e o uso de ácido nítrico diluído poderia não ser suficiente para carrear os analitos para a solução.⁸²

De acordo com a Figura 5, foi observado que não há diferença significativa nos valores para todos os analitos na concentração de HNO_3 7 mol L^{-1} após determinação por ICP-MS e comparação com MAWD-2. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos para Cd, Co, Ni e Pb com HNO_3 7, 10 e 14,4 mol L^{-1} após determinação por ICP-MS. Entretanto, houve diferença significativa entre o valor para Cr na concentração de HNO_3 7 mol L^{-1} quando comparado com HNO_3 10 e 14,4 mol L^{-1} .

Não houve diferença significativa entre os valores obtidos por ICP-MS e PN-ICP-OES para Co, Cr e Ni nas concentrações de HNO_3 7, 10 e 14,4 mol L^{-1} , de acordo com a Figura 6. Também não houve diferença significativa entre os valores obtidos por ICP-MS e PN-ICP-OES para Ni e Cr quando utilizado HNO_3 4 mol L^{-1} . Entretanto, a determinação de Co na concentração de HNO_3 4 mol L^{-1} só foi possível por ICP-MS já que o valor obtido por PN-ICP-OES ficou abaixo do LD (0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$). Cabe destacar que os valores para Cd e Pb para todas as concentrações de HNO_3 utilizadas e posterior determinação por PN-ICP-OES ficaram abaixo do LD (Tabela A2, em anexo).

Assim, a decomposição do chocolate por MIC pode ser efetuada com 500 mg de amostra e HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora para posterior determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS. A utilização de ácidos diluídos é atrativa pela possibilidade de obtenção de baixos valores dos brancos com consequente diminuição dos LDs. O teor de RCC nesta condição foi de $0,20 \pm 0,02\%$, valor que representa uma diminuição de seis vezes quando comparado com o valor de RCC obtido por MAWD-2 ($1,2 \pm 0,1\%$) o que mostra a eficiente degradação da matéria orgânica por MIC. Os valores de RCC baixos para MIC podem ser explicados pelas altas temperaturas alcançadas durante a decomposição (maiores que $1350\text{ }^\circ\text{C}$) e, nesta condição, quase toda a matéria orgânica pode ser completamente decomposta liberando os analitos da matriz.⁶⁷ O teor de RCC nas soluções resultantes da decomposição por MIC utilizando como solução absorvedora HNO_3 4, 10 e 14,4 mol L^{-1} foi de $0,24 \pm 0,03\%$, $0,16 \pm 0,01\%$ e $0,11 \pm 0,01\%$, respectivamente.

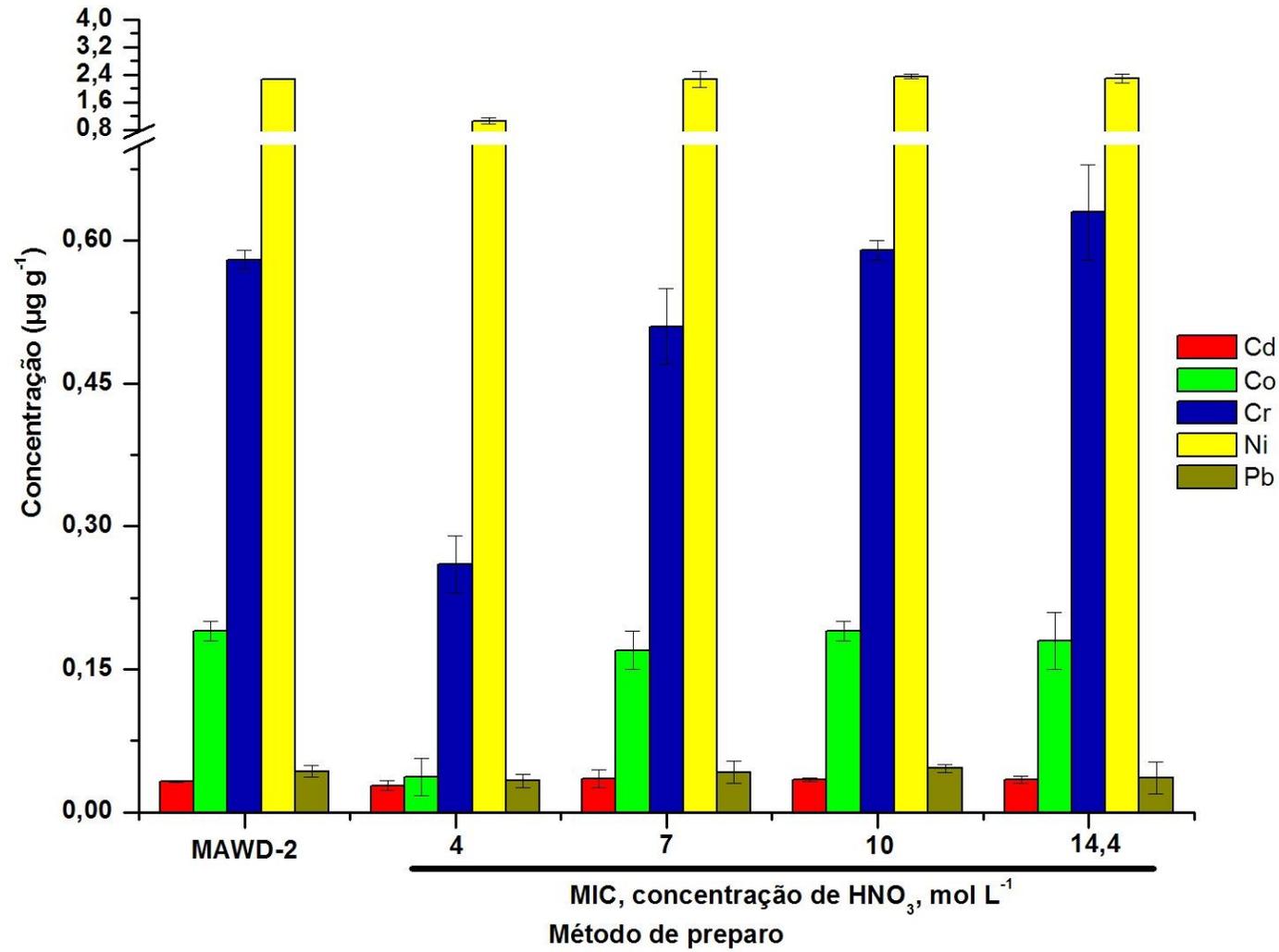


Figura 5. Concentração de Cd, Co, Cr, Ni e Pb na amostra de chocolate após decomposição por MAWD-2 e MIC e determinação por ICP-MS.

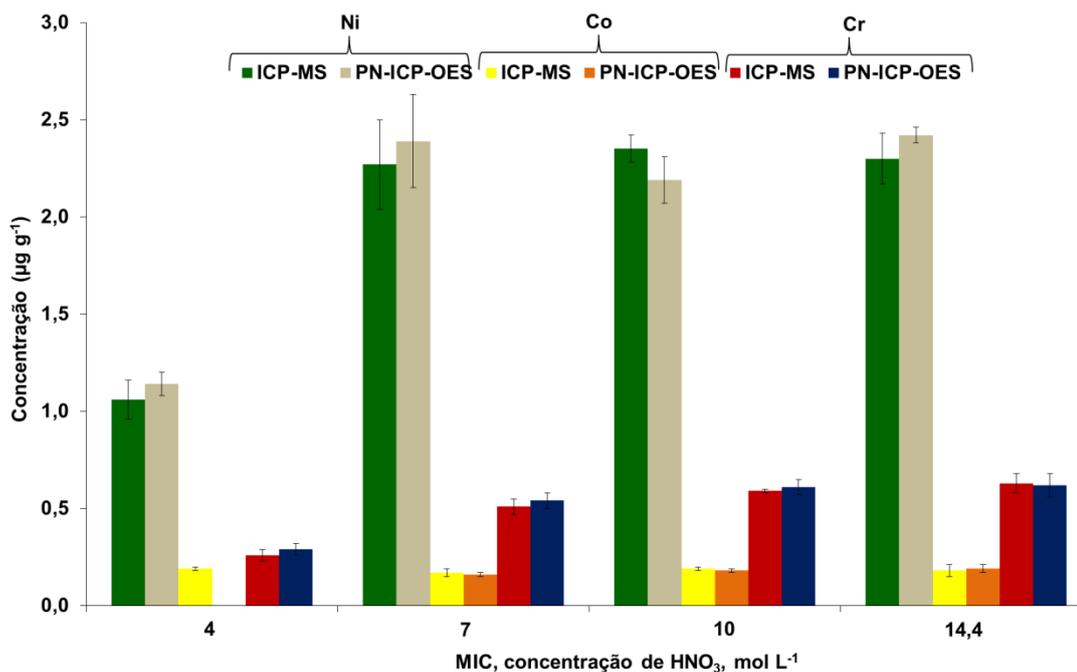


Figura 6. Comparação dos valores obtidos para Co, Cr e Ni por ICP-MS e PN-ICP-OES após decomposição por MIC.

4.3. Avaliação dos parâmetros do nebulizador ultrassônico

Uma seleção adequada do sistema de introdução da amostra é um passo crítico quando são requeridas determinadas figuras de mérito como LD e limite de quantificação (LQ).⁸³ Dessa forma, com os nebulizadores pneumáticos, somente 1-2% da amostra efetivamente alcança o plasma. Uma maneira de aumentar a eficiência de introdução de amostra é a nebulização ultrassônica.⁸⁴ Este tipo de nebulização apresenta um sistema de dessolvatação o qual reduz a carga de solvente no plasma. Além disso, ocorre redução do tamanho médio das gotículas de aerossol, o que, em parte, facilita a dessolvatação do aerossol e a vaporização no plasma.⁸⁵

Assim, o fabricante⁷⁰ do equipamento recomenda uma condição de operação inicial (item 3.1 *Materiais e Métodos*) como condição satisfatória de trabalho para a maioria dos elementos. Entretanto, é necessário uma etapa de otimização a fim de se encontrar uma condição de compromisso de máxima resposta do equipamento.⁷⁰ Em virtude disto, os principais parâmetros que foram avaliados foram: vazão da bomba peristáltica, potência do gerador de rádio frequência, vazão do gás auxiliar, vazão do gás de nebulização, temperatura de aquecimento do tubo em U e

temperatura do condensador. Para a otimização dos referidos parâmetros foi utilizada uma solução padrão de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ multielementar e um branco. As linhas de emissão selecionadas foram Cd 228,802 nm, Co 238,892 nm, Cr 262,716 nm, Ni 231,604 nm e Pb 220,353 nm. Assim, partiu-se da condição recomendada pelo fabricante e a otimização foi realizada contemplando a faixa que poderia ser variada para cada parâmetro. Após, avaliada e fixada à faixa ideal de trabalho para um determinado parâmetro, o mesmo foi utilizado para os testes posteriores.

4.3.1. Avaliação da vazão da bomba peristáltica

A bomba peristáltica garante uma constante vazão de líquido, seja qual forem as diferenças de viscosidade entre as amostras e padrões.⁸⁶ Assim, a vazão da bomba foi variada de 1 a 3 mL min^{-1} . Na Figura A1, em anexo, está mostrado o gráfico para Cd, Co, Cr, Ni e Pb que representa a intensidade do sinal como uma função da vazão da bomba.

Conforme observado na Figura A1 para todos os elementos a maior intensidade do sinal foi verificada na vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Portanto, a fim de estabelecer uma condição de compromisso de máxima intensidade do sinal para os elementos sob estudo a vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ foi adotada para os testes posteriores.

4.3.2. Avaliação da potência

Um dos parâmetros que podem afetar a robustez do plasma é a potência do gerador de rádio frequência. Além disso, as condições de robustez do plasma são alcançadas em potências da ordem de 1400 W.⁸⁷ O fabricante⁷⁰ do equipamento recomenda como condição satisfatória de operação a potência de 1200 W para a maioria dos elementos. Em função disso, a fim de encontrar uma condição de compromisso onde fosse observada a maior intensidade do sinal, a potência foi variada de 800 a 1400 W. Na Figura A2, em anexo, está mostrado o gráfico para Cd, Co, Cr, Ni e Pb em função da intensidade do sinal e da potência do gerador de rádio frequência aplicada.

Foi observado que na potência de 1400 W todos os elementos apresentaram um aumento da intensidade do sinal conforme o correspondente aumento da potência aplicada. Entretanto, foi observado para Pb um desvio padrão relativamente alto nas potências de 1200 e 1400 W. Este fato poderia ser explicado pela baixa intensidade do sinal do padrão de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb o que, de certa forma, estaria numa zona de um considerável ruído proporcionando flutuações na intensidade observada. Assim, para todos os elementos, a potência de 1400 W foi utilizada para os testes posteriores.

4.3.3. Avaliação da vazão do gás auxiliar

O gás auxiliar garante que o plasma seja afastado da ponta do injetor impedindo, desta forma, a fusão do mesmo.⁸⁸ De acordo com a Tabela 7 (item 3.1 *Materiais e Métodos*) o fabricante⁷⁰ recomenda uma vazão do gás auxiliar de $0,5 \text{ L min}^{-1}$ e, para a etapa de otimização, a vazão do gás auxiliar foi variada de $0,2$ a $0,7 \text{ L min}^{-1}$. Na Figura A3, em anexo, está mostrado o gráfico para Cd, Co, Cr, Ni e Pb que representa a intensidade do sinal em função da vazão do gás auxiliar. De acordo com a Figura A3, para todos os elementos, na vazão de $0,2 \text{ L min}^{-1}$ foi observada a máxima intensidade do sinal e esta vazão foi utilizada nos estudos posteriores.

4.3.4. Avaliação da vazão do gás de nebulização

A otimização da vazão do gás de nebulização contemplou as vazões de $0,3$; $0,5$; $0,7$; $0,9$ e $1,1 \text{ L min}^{-1}$. Na Figura A4, em anexo, está mostrado o gráfico para Cd, Co, Cr e Ni e Pb no qual estão relacionados a intensidade do sinal com a vazão do gás de nebulização. Conforme observado na Figura A4, para todos os elementos há um aumento na intensidade do sinal entre as vazões de $0,3$ e $0,5 \text{ L min}^{-1}$ e, posteriormente, há uma queda da intensidade ao se aplicarem vazões mais altas ($0,7$ a $1,1 \text{ L min}^{-1}$). Segundo Rocha *et al.*⁸⁹ aplicando-se maiores vazões do gás de nebulização aumentaria a turbulência dentro do nebulizador ultrassônico e reduziria a eficiência do resfriamento termoelétrico no condensador. Além disso, o tempo de residência do analito no plasma é reduzido, diminuindo a sensibilidade do método e

aumentado o desvio padrão relativo das medidas. Por conseguinte, a vazão do gás de nebulização de $0,5 \text{ L min}^{-1}$ foi escolhida e utilizada para os testes posteriores.

4.3.5. Avaliação da temperatura do tubo em U e da temperatura do condensador

Devido à alta eficiência de nebulização e o pequeno tamanho das gotas geradas no sistema de nebulização ultrassônico, uma grande quantidade de solvente também é transportado ao plasma e isto prejudica a capacidade de atomização e ionização, bem como poderá ocorrer o resfriamento ou mesmo a extinção do plasma. Este problema de excesso de solvente pode ser significativamente reduzido pelo uso de um sistema de dessolvatação, o qual consiste de um tubo aquecido onde o solvente é termicamente evaporado, seguido de um condensador onde o vapor do solvente é condensado e removido.⁸⁸

Uma vez que o fabricante⁷⁰ apresentou a faixa de temperaturas que poderiam ser utilizadas para ambos os parâmetros, temperatura do tubo em U (120 a 160 °C) e temperatura do condensador (-5 a +10 °C), para uma correta avaliação foram selecionadas temperaturas do tubo em U e do condensador onde se pudesse claramente observar a interação destes dois fatores em toda a extensão de temperatura. Primeiramente, a partir de uma avaliação inicial, fixada a temperatura do tubo em U em 140 °C e variando a temperatura do condensador de -5 a +10 °C foi observado que para todos os elementos sob estudo a maior intensidade do sinal foi na temperatura do condensador de + 10 °C. Entretanto, foi observado que ao longo do percurso da amostra até o ICP-OES ocorria a condensação do aerossol na linha de transferência. Em função disto, no intuito de garantir a eficiente condensação do vapor do solvente na passagem pelo condensador, a otimização deste parâmetro foi efetuada variando a temperatura de -5 a 0 °C conforme a Tabela A1, em anexo.

Na Figura A5, em anexo, está mostrado o gráfico para Cd, Co, Cr, Ni e Pb onde estão relacionados a intensidade do sinal como uma função da temperatura do tubo em U e temperatura do condensador. Foi observado que para Cd e Cr a maior intensidade do sinal foi quando se utilizou a temperatura do tubo em U em 140 °C e a temperatura do condensador em 0 °C. Não foram observadas diferenças

significativas nas combinações de 120/0, 130/0, 140/0 e 150/0 para Co e, além disso, para este elemento na combinação 140/0 houve a maior intensidade do sinal (890,39). Já para Pb, conforme a Figura A5, a variação da intensidade do sinal nas diferentes combinações de temperatura do tubo em U e temperatura do condensador foi de 113,24 (160/-2) a 126,65 (130/0).

Pela análise do gráfico da Figura A5, Ni apresentou um comportamento semelhante frente as diferentes combinações de temperatura do tubo em U e temperatura do condensador. A fim de encontrar uma condição de compromisso que contemplasse todos os elementos sob estudo, a condição de temperatura do tubo em U em 140 °C e temperatura do condensador em 0 °C foi escolhida para todos os elementos. A Tabela 11 mostra as condições escolhidas após avaliação da vazão da bomba peristáltica, potência do gerador de rádio frequência, vazão do gás auxiliar, vazão do gás de nebulização, temperatura de aquecimento do tubo em U e temperatura do condensador para a posterior determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por USN-ICP-OES.

Tabela 11. Condições escolhidas após a avaliação dos parâmetros do nebulizador ultrassônico.

Parâmetro	Condições
Potência do gerador (W)	1400
Gás do Plasma (L min ⁻¹)	15
Gás Auxiliar (L min ⁻¹)	0,2
Gás de Nebulização (L min ⁻¹)	0,5
Vazão da Bomba (mL min ⁻¹)	1,5
Temperatura do tubo em U (°C)	140
Temperatura do condensador (°C)	0

Após a avaliação e escolha dos parâmetros de acordo com a Tabela 11, foi realizada a determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por USN-ICP-OES nas amostras decompostas pelos diferentes métodos utilizados neste trabalho.

4.4. Comparação dos resultados para Cd, Co, Cr, Ni e Pb obtidos por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 estão mostrados os resultados para Cd, Co, Cr e Ni, respectivamente, após as determinações por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES nas soluções obtidas pela decomposição do chocolate por via seca, decomposição por via úmida com bloco digestor, MAWD-1, MAWD-2, MAWD-3, MAWD-4 e MIC 4, 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹. Vale ressaltar que as soluções obtidas por SRC MAWD não foram analisadas por USN-ICP-OES em função da indisponibilidade do equipamento de SRC MAWD para completar as análises.

De acordo com a Figura 7, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos por ICP-MS e USN-ICP-OES para Cd após decomposição do chocolate por via seca, MAWD-1, MAWD-2, MAWD-3, MAWD-4 e MIC 4, 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹. Vale ressaltar que para todos os métodos de preparo avaliados, a concentração de Cd foi abaixo do LD quando foi efetuada a determinação por PN-ICP-OES (Tabela A2, em anexo). Nas amostras decompostas por bloco digestor a concentração de Cd por USN-ICP-OES foi abaixo do LD (0,004 µg g⁻¹), uma vez que foi necessário efetuar uma diluição na amostra, pois a mesma apresentava um alto teor de carbono residual o que, possivelmente, poderia comprometer na determinação. Cabe destacar que o valor obtido para Cd após a decomposição utilizando bloco digestor e determinação por ICP-MS foi de 0,035 ± 0,002 µg g⁻¹.

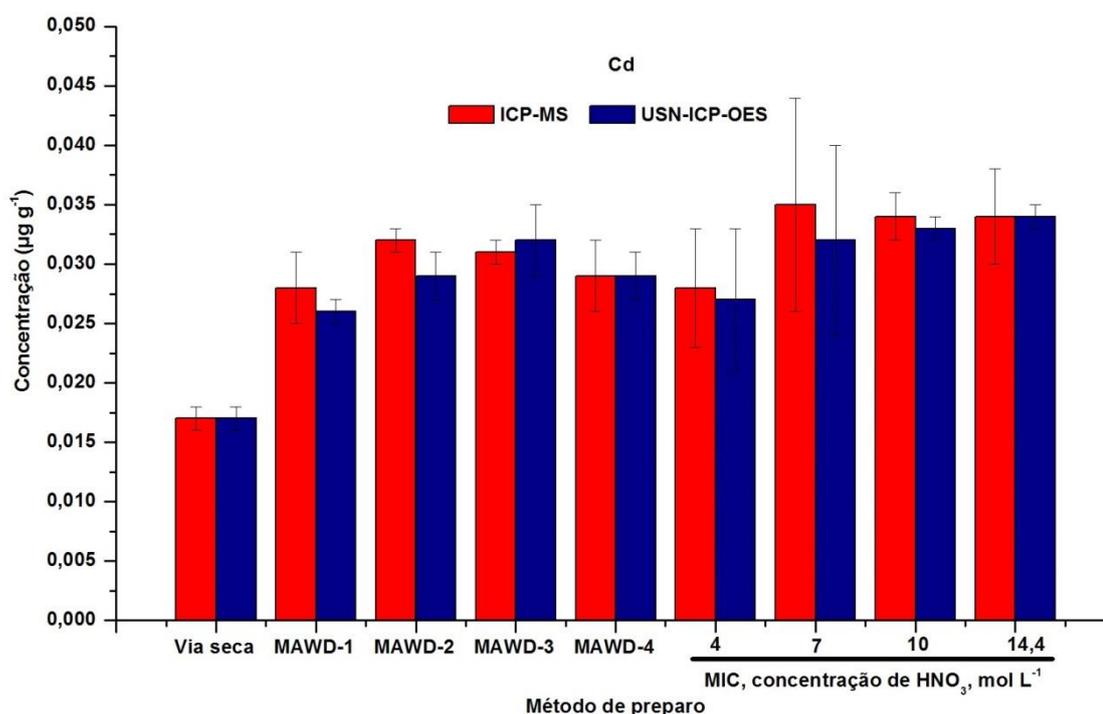


Figura 7. Comparação dos valores para Cd após determinação por ICP-MS e USN-ICP-OES.

Com relação a Co, de acordo com a Figura 8, não houveram diferenças significativas dos valores quando comparando a determinação por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES nas decomposições por via seca e MIC 7, 10, e 14,4 mol L⁻¹. Entretanto, na determinação de Co por PN-ICP-OES nas amostras decompostas por bloco digestor, MAWD-1, MAWD-2, MAWD-3, MAWD-4 e MIC 4 mol L⁻¹ os valores ficaram abaixo do LD (0,22; 0,23; 0,28; 0,21; 0,22 e 0,11 µg g⁻¹, respectivamente). Foi possível a determinação de Co por PN-ICP-OES quando foi efetuada a decomposição do chocolate por via seca e MIC utilizando HNO₃ 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹ em função dos menores LDs obtidos por estes métodos (0,06; 0,12; 0,12 e 0,14 µg g⁻¹, respectivamente).

Cromo não apresentou diferenças significativas entre os resultados por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES para todos os métodos de preparo avaliados conforme a Figura 9. Entretanto, não foi possível a determinação de Cr após a decomposição utilizando o método MAWD-4 por ICP-MS devido a interferências poliatômicas (item 4.1 *Apresentação e Discussão dos Resultados*).

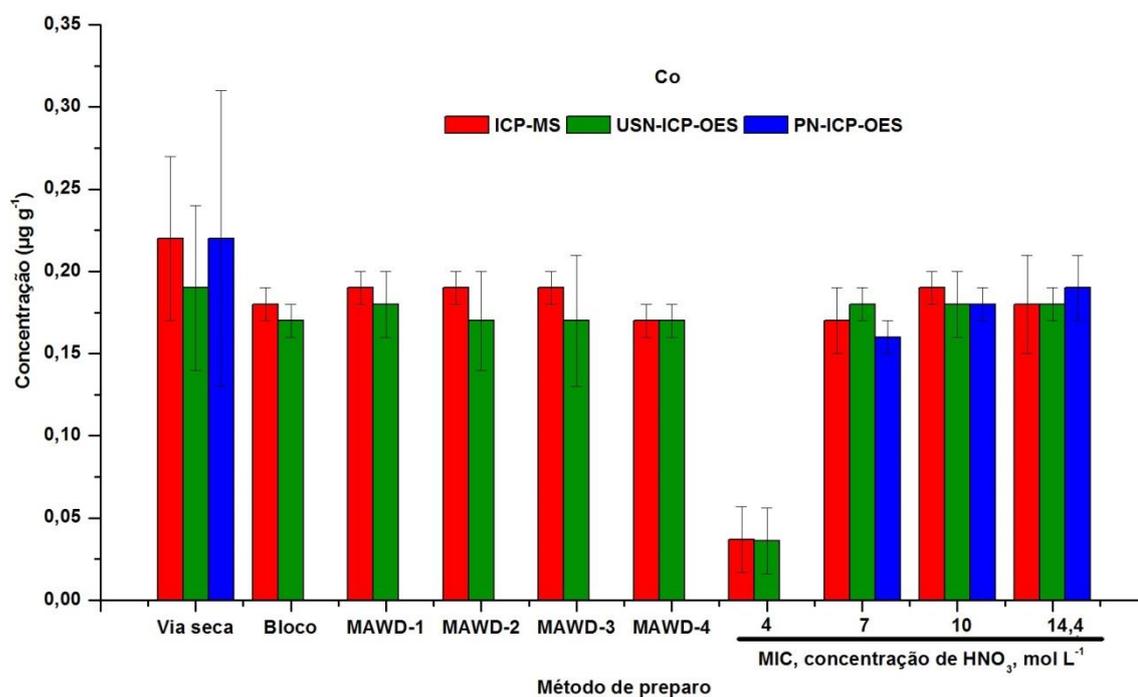


Figura 8. Comparação dos valores para Co após determinação por ICP-MS, USN-ICP-OES e PN-ICP-OES.

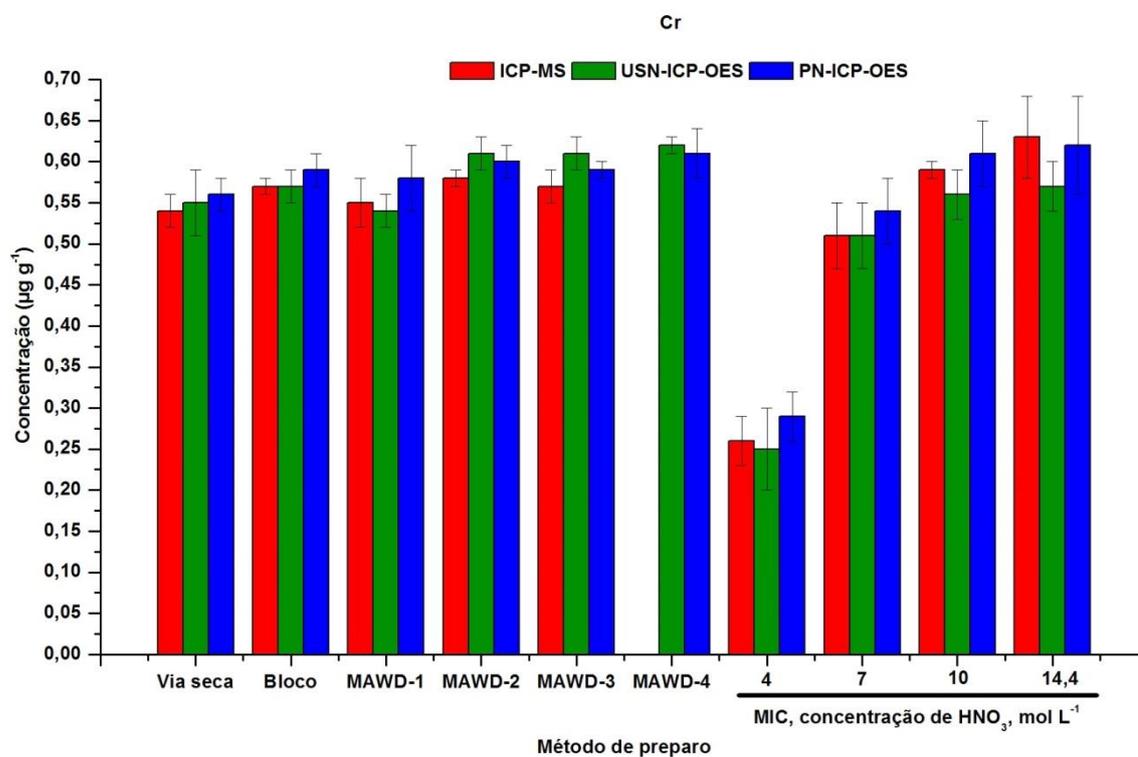


Figura 9. Comparação dos valores para Cr após determinação por ICP-MS, USN-ICP-OES e PN-ICP-OES.

Foram observados que os resultados para Ni por USN-ICP-OES não foram concordantes quando comparados com os resultados obtidos por ICP-MS e PN-ICP-OES (Figura 10). Apesar de ocorrer um aumento na eficiência de introdução da amostra utilizando o sistema de nebulização ultrassônica, por outro lado, os efeitos de matriz (como oriundos da presença de elementos facilmente ionizáveis e metais alcalino terrosos) podem ser exacerbados comparados aqueles observados usando nebulização convencional.⁸⁵

Segundo Todolí *et al.*⁹⁰ a depressão da intensidade de emissão para alguns elementos induzida por matrizes contendo Na e Ca em ICP-OES seria em função de mudanças nas características térmicas do plasma o que acabaria comprometendo a eficiência de excitação do analito. Uma outra razão que poderia explicar os efeitos de matriz mais pronunciados com a USN é que a eficiência do acoplamento entre o transdutor (cristal) e a amostra pode variar dependendo da matriz. Este efeito poderia levar a uma produção do aerossol menos eficiente e, portanto, proporcionar mudanças no sinal analítico. Outra questão é que com a USN a quantidade de água que entra no plasma diminui e isto poderia resultar em uma baixa transferência de energia para o analito.

Brenner *et al.*⁹¹ avaliaram a influência de soluções contendo em torno de 0,1% de Na e Ca sobre os LDs de vários elementos após determinação por USN-ICP-OES. Foi observado que para Ni, utilizando vista axial e para três linhas iônicas (221,647, 231,604 e 232,003 nm) houve uma considerável piora nos LDs para USN-ICP-OES com soluções contendo em torno de 0,1% de Na e Ca em comparação com as soluções sem a adição destes elementos.

Como mostrado na Tabela 2 (item 2.1 *Revisão da Literatura*) e de acordo com outros dados da literatura^{17b,22,49,59} o chocolate apresenta quantidades significativas de elementos como Na e Ca já que são macronutrientes naturalmente presentes no cacau. Portanto, o comportamento observado para Ni após a determinação por USN-ICP-OES poderia ser em função da presença de Na e Ca no chocolate. Entretanto, estabelecer uma conclusão exata das causas responsáveis pelas interferências observadas neste trabalho necessitaria de um estudo mais sistemático em função da conjunção de fatores, como mencionado nos parágrafos acima, que podem propiciar a depressão da intensidade do sinal para USN-ICP-OES. Diante disso, os resultados para Ni só puderam ser avaliados comparando os dados obtidos por ICP-MS e PN-ICP-OES os quais não apresentaram diferença significativa.

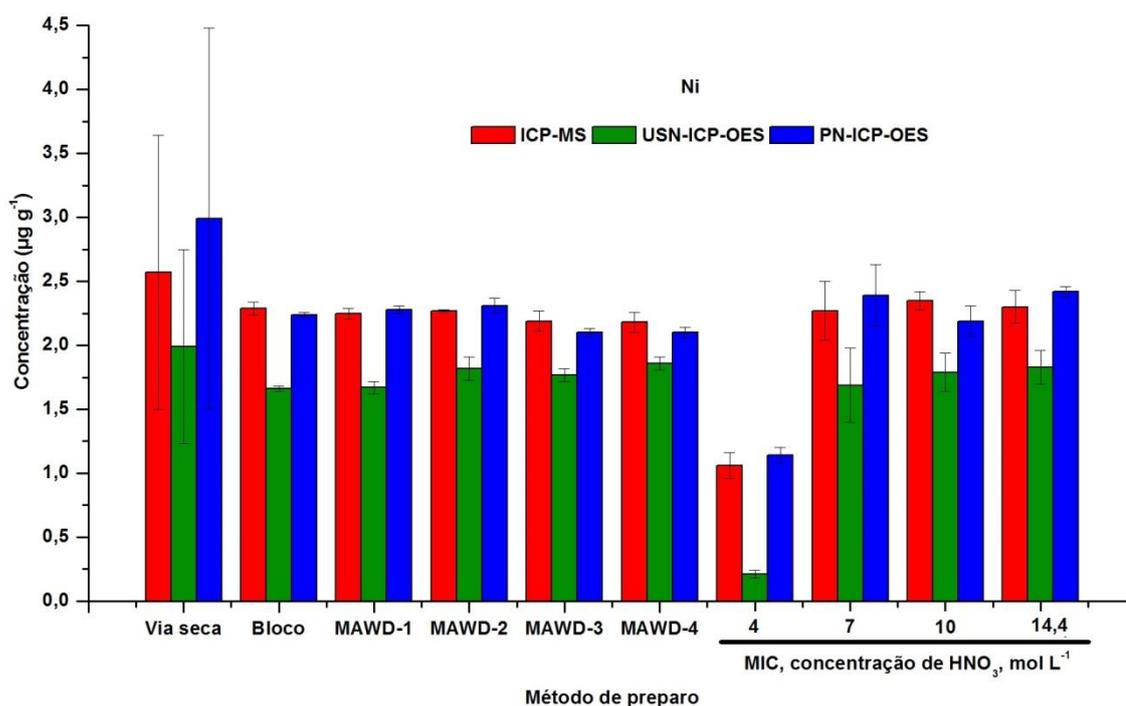


Figura 10. Comparação dos valores para Ni após determinação por ICP-MS, USN-ICP-OES e PN-ICP-OES.

Os resultados obtidos para Pb após a decomposição por via seca, bloco digestor, MAWD-1, MAWD-2, MAWD-3, MAWD-4 e MIC 4, 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹ e determinados por PN-ICP-OES e USN-ICP-OES ficaram abaixo do LD. Contudo, houve uma significativa melhora nos LDs obtidos para Pb após a determinação por USN-ICP-OES quando comparados com os LDs obtidos após a determinação por PN-ICP-OES conforme a Tabela A2, em anexo.

A USN apresenta algumas vantagens relevantes frente a PN. Há um aumento considerável na eficiência de introdução da amostra na USN.⁹² Além disso, o nebulizador ultrassônico produz um aerossol de densidade de partícula muito maior que o nebulizador pneumático. A maior densidade do aerossol resulta na produção de gotículas de tamanho muito mais apropriado do que as gotas com a nebulização pneumática, tornando a conversão para espécies atômicas e iônicas mais fácil.⁹³

Cabe ressaltar que a polidispersibilidade do aerossol formado, no caso da PN, é uma significativa fonte de ruído. Como grandes gotas vão sofrer dessolvatação e vaporização há um resfriamento do plasma na vizinhança das gotas pequenas que alcançaram o estágio de atomização, ionização e/ou estágio de excitação, e há o resfriamento do plasma em zonas contendo átomos e íons livres, portanto reduzindo

o número de átomos excitados ou íons. Consequentemente, condições que levam a um menor tamanho das gotas, como na USN, drasticamente reduzem esta possível fonte de ruído.⁸⁵

No presente trabalho foi observada uma melhora significativa nos LDs por USN-ICP-OES para todos os analitos quando comparados com os LDs obtidos por PN-ICP-OES, conforme Tabela A2, em anexo. Foi possível, por exemplo, a determinação de Cd na amostra de chocolate por USN-ICP-OES em quase todos os métodos de preparo avaliados (o valor para Cd por PN-ICP-OES ficou abaixo do LD).

A substancial melhora nos LDs é de importância relevante, pois a utilização da nebulização ultrassônica com ICP-OES pode configurar uma alternativa à determinação por ICP-MS, uma vez que este instrumento não está disponível em muitos laboratórios. Contudo, um estudo prévio da amostra a ser analisada se faz pertinente, pois interferências podem ocorrer em função das características da matriz.⁹⁰ No caso do chocolate, estabelecer uma composição precisa é, de certa forma, difícil, pois a composição varia em todo o mundo devido as diferenças de ingredientes utilizados.⁹⁴ Contudo, a USN-ICP-OES foi satisfatória para a determinação de Cd, Co, Cr e Pb no chocolate em quase todos os métodos de preparo avaliados.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram avaliados os principais métodos de preparo de amostra reportados na literatura para a decomposição de chocolate e, adicionalmente, foi proposta a decomposição por MIC para posterior determinação de Cd, Co, Cr, Ni e Pb por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES.

Na decomposição de amostras de chocolate em barra por MAWD-3 pode-se utilizar pedaços cortados sem necessidade de moagem. Vale destacar que na grande maioria dos trabalhos publicados na literatura, não há uma definição clara da forma de apresentação do chocolate (pó, barra, etc.). Além disso, o procedimento proposto por MIC 7 mol L^{-1} está de acordo com as atuais tendências para decomposição de amostras, tais como o uso de mínimas quantidades de reagentes (principalmente de ácidos concentrados), rapidez, segurança, eficiência de decomposição, a partir dos baixos valores de RCC observados e adequabilidade à técnica de determinação. Cabe ressaltar que nos trabalhos publicados na literatura que visam à determinação de metais por técnicas que envolvem o uso de plasmas, tais como ICP-OES e ICP-MS, a informação com relação aos valores de RCC esta ausente o que dificulta a avaliação do quão eficiente foi um determinado método.

Além da técnica de ICP-MS, empregando a USN-ICP-OES foi possível a determinação de Cd, Co e Cr na amostra de chocolate. É interessante mencionar que os valores para Cd obtidos por PN-ICP-OES ficaram abaixo do LD para todos os métodos avaliados. Isto é um aspecto relevante da USN-ICP-OES, na perspectiva de determinação de analitos em baixas concentrações, no caso da indisponibilidade de instrumentos de ICP-MS. Outro fator a destacar é a melhora significativa nos limites de detecção para Pb obtidos por USN-ICP-OES para todos os métodos de preparo avaliados quando comparados com os limites de detecção obtidos por PN-ICP-OES. Apesar da determinação de Ni não ter sido possível por USN-ICP-OES, este elemento tem um histórico de apresentar elevadas concentrações no chocolate e a PN-ICP-OES pode ser uma alternativa satisfatória.

Uma vez que o consumo de chocolate aumenta a cada ano, a disponibilidade de métodos que possibilitem a avaliação da concentração de metais é um quesito importante para garantir a adequabilidade do produto a determinados padrões de qualidade. Além disso, uma vez que existe uma preocupação com relação a

aspectos toxicológicos nos alimentos, é necessária uma uniformização das concentrações permitidas para metais em chocolate já que, em muitos casos, são baseadas em legislações regionais. Ademais, em função do carácter multielementar das técnicas de ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES, estudos adicionais podem possibilitar a determinação de outros elementos em chocolate estendendo a caracterização elementar da amostra.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate: a review, *Trends in Food Science and Technology* 18 (2007) 290-298.
- 2 Steinberg, F. M., Bearden, M. M., Keen, C. L., Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health, *Journal of the American Dietetic Association* 103 (2003) 215-223.
- 3 Dillinger, T. L., Barriga, P., Escárcega, S., Jimenez, M., Lower, D. S., Grivetti, L. E., Food of the gods: cure for humanity? a cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate, *American Society for Nutritional Sciences* 130 (2000) 2057-2072.
- 4 Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 175 de 08 de julho de 2003. Regulamento técnico de avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 09 de julho de 2003.
- 5 Srogi, K., Assessment of selected heavy metal contents in medicinal plants, tea leaves and chocolate using atomic absorption spectrometry, *Acta Toxicology* 14 (2006) 117-128.
- 6 Watson, R. R., Preedy, V. R., Zibadi, S., Chocolate in Health and Nutrition, Humana Press, New York, 2013, 553p.
- 7 Lopez, L., Lo Monaco, S., Geochemical implications of trace elements and sulfur in the saturate, aromatic and resin fractions of crude oil from the Mara and Mara Oeste fields, Venezuela, *Fuel* 83 (2004) 365-374.
- 8 Smith, F. E., Arsenault, E. A., Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry, *Talanta* 43 (1996) 1207-1268.
- 9 Knapp, G., Maichin, B., Baumgartner, U., Interferences in ICP-OES by organic residue after microwave-assisted sample digestion, *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 220-222.

10. Horvat, M., Lupina, V., Pihlar, B., Determination of total mercury in coal fly ash by gold amalgamation cold vapour atomic absorption spectrometry, *Analytical Chimica Acta* 243 (1991) 71-79.
11. Anderson, R., Sample Pretreatment and Separation, John Wiley & Sons, New York, 1987, 81-124.
12. Barin, J. S., Flores, E. M. M., Knapp, G., in: Arruda, M. A. Z. (Ed), Trends in sample preparation, Nova Science, New York, 2006.
13. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 264 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre chocolate e produtos de cacau. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 25 de setembro de 2005.
14. Wolgast, J., Anklan, E., Review in polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, *Food Research International* 33 (2000) 423-447.
15. Lippi, G., Franchini, M., Montagnana, M., Favalaro, E. J., Guidi, G. C., Targuer, G., Dark chocolate: consumption for pleasure or therapy? *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 28 (2009) 482-488.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Diário Oficial da União, Poder executivo, Brasília, 03 de maio de 1999.
17. Farah, R., Chocolate: energia e saúde, Alaúde Editorial, São Paulo, 2008; a 45-47, b 53-60.
18. Belscak, A., Komes, D., Horzic, D., Ganic, K. K., Karlovic, D., Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition, *Food Research International* 42 (2009) 707-716.
19. Associação Brasileira da indústria de chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados. Disponível em: www.abicab.org.br/exportacao/noticias-exportacao/setor-brasileiro-de-chocolate, acesso em 10/2013.

20. Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J., Characterization of melting properties in dark chocolates from varying particle size distribution and composition using differential scanning calorimetry, *Food Research International* 41 (2008) 751-757.
21. Alampresse, C., Datei, L., Semeraro, Q., Optimization of processing parameters of a ball mill refiner for chocolate, *Journal of Food Engineering* 83 (2007) 629-636.
22. Chocolate Manufacturers Association. National Confectioners Association: nutrient database for three selected major ingredients used in the NCA/CMA recipe modeling database (chocolate liquor, cocoa powder, and cocoa butter), USA, 1997.
23. Leggli, C. V. S., Bohrer, D., do Nascimento, P. C., de Carvalho, L. M., Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron in emulsified chocolate samples by flame atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry* 124 (2011) 1189-1193.
24. Leggli, C. V. S., Bohrer, D., do Nascimento, P. C., de Carvalho, L. M., Gobo, L. A., Determination of aluminum, copper and manganese content in chocolate samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a microemulsion technique, *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 465-468.
25. Rehman, S., Husnain, S. M., Assessment of trace metal contents in chocolate samples by atomic absorption spectrometry, *Journal of Trace Element Analysis* 1 (2012) 1-11.
26. Grembecka, M., Szefer, P., Differentiation of confectionery products based on mineral composition, *Food Analytical Methods* 5 (2012) 250-259.
27. Noel, L., Chekri, R., Millour, S., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V., Leblanc, J. C., Guerin, T., Li, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se and Mo levels in foodstuffs from the second french total diet study, *Food Chemistry* 132 (2012) 1502-1513.
28. Jalbani, N., Kazi, T. G., Afridi, H. I., Arain, M. B., Determination of toxic metals in different brand of chocolates and candies, marketed in Pakistan, *Pakistan Journal Analytical Environment Chemistry* 10 (2009) 48-52.
29. Guldás, M., Comparison of digestion methods and trace elements determination in chocolates with pistachio using atomic absorption spectrometry, *Journal of Food and Nutrition Research* 47 (2008) 92-99.

30. Kuo, S. M., Leavitt, P. S., Lin, C. P., Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells, *Trace Elements Research* 62 (1998) 135-153.
31. Selavpathy, P., Sarala Devi, G., Nickel in Indian chocolates (toffees), *Indian Journal of Environmental Health* 37 (1995) 123-125.
32. Melsallam, A. S., Heavy metal contents of canned orange juice, *Food Chemistry* 26 (1987) 47-58.
33. Underwood, E. J., Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Academic Press, New York, 1977, 545p.
34. Nielson, F. H., Nickel toxicity, in: Advances in Modern Toxicology (Toxicology of Trace Elements), Hemisphere Publishing Corporation, Cambridge, 1977, 129-146.
35. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria, Geneva, 1991, 286p.
36. Kim, K. C., Park, Y. B., Lee, M. J., Kim, J. B., Huh, J. W., Kim, D. H., Lee, J. B., Kim, J. C., Levels of heavy metals in candy packages and candies likely to be consumed by small children, *Food Research International* 41 (2008) 411-418.
37. Bradley, E. L., Castle, L., Dines, T. J., Fitzgerald, A. G., Gonzalez Tunon, P., Jickells, S. M., Test method for measuring non-visible set-off from inks and lacquers on the food contact surface of printed packaging materials, *Food Additives and Contaminants* 22 (2005) 490-502.
38. Martins, R., Dossiê técnico: processamento de chocolate, Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
39. Robards, K., Worsfold, P., Cadmium: toxicity and analysis: a review, *Analyst* 116 (1991) 549-568.
40. Gál, J., Hursthouse, A., Tatner, P., Stewart, F., Welton, R., Cobalt and secondary poisoning in the terrestrial food chain: data review and research gaps to support risk assessment, *Environment International* 34 (2008) 821-838.
41. Tietz, N. W., Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Fundamentos de Química Clínica, Elsevier, São Paulo, 2008, 633-648.

42. Pedro, N. A. R., Oliveira, E., Cadore, S., Study of the mineral content of chocolate flavoured beverages, *Food Chemistry* 95 (2006) 94-100.
43. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: www.codexalimentarius.org/input/download/report/.../al68_10e.pdf, acesso em 04/2013.
44. Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1 ed., Piracicaba (2010); a 1-12, b 146-154, c 184-186.
45. Pereira, J. S. F., Determinação de cloreto por cromatografia de íons em petróleo extrapesado, coque e resíduo de vácuo após decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por micro-ondas, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
46. Knapp, G., Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration, *Mikrochimica Acta* 2 (1991) 445-455.
47. The United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <http://www.epa.gov/fem/methcollectns.htm>, acesso em 09/2013.
48. Dahiya, S., Karpe, R., Hegde, A. G., Sharma, R. M., Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India, *Journal of Food Composition and Analysis* 18 (2005) 517-522.
49. Chekri, R., Noel, L., Millour, S., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V., Leblanc, J. C., Guerin, T., Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second french total diet study, *Journal of Food Composition and Analysis* 25 (2012) 97-107.
50. Santos, W. N. L., da Silva, E. G. P., Fernandes, M. S., Araujo, R. G. O., Costa, A. C. S., Vale, M. G. R., Ferreira, S. L. C., Determination of copper in powdered chocolate samples by slurry-sampling flame atomic absorption spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 1099-1102.
51. Duran, A., Tuzen, M., Soylak, M., Trace metal contents in chewing gums and candies marketed in Turkey, *Environmental Monitoring and Assessment* 149 (2009) 283-289.

52. Mester, Z., Sturgeon, R., Sample preparation for trace element analysis, volume XLI, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Wilson & Wilson's, Ottawa, 2003; a 176-178, b 193-233.
53. Naqvi, I. I., Saeed, Q., Farrukh, A., Determination of trace metals (Co, Cu, Cd, Pb, Fe, Ni and Mn) in selected sweets of different shops of Karachi City by atomic absorption spectroscopy, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8 (2004) 1355-1359.
54. Rankin, C. W., Nriagu, J. O., Aggarwal, J. K., Arowolo, T. A., Adebayo, K., Flegal, A. R., Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination, *Environmental Health Perspectives* 113 (2005) 1344-1348.
55. Sulcek, Z., Povondra, P., *Methods of decomposition in inorganic analysis*, CRC Press, Boca Raton, 1989; a 115-164, b 269-304.
56. Kingston, H. M., Haswell, S. J., *Microwave-enhanced chemistry, fundamentals. Sample preparation and applications*, American Chemical Society, Washington, 1997, 4-11.
57. Kingston, H. M., Jassie, L. B., *Introduction to microwave sample preparation. Theory and practice*, American Chemical Society, Washington, 1988, 7-17.
58. Millour, S., Noel, L., Chekri, R., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V., Leblanc, J. C., Guerin, T., Strontium, silver, tin, iron, tellurium, gallium, germanium, barium and vanadium levels in foodstuffs from the second french total diet study, *Journal of Food Composition and Analysis* 25 (2012) 108-129.
59. Nardi, E. P., Evangelista, F. S., Tormen, L., SaintPierre, T. D., Curtius, A. J., de Souza, S. S., Barbosa, F., 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* 112 (2009) 727-73.
60. Martinez, T., Lartigue, J., Zarazua, G., Avila-Perez, P., Navarrete, M., Tejeda, S., Total reflection X-ray fluorescence analysis of trace-elements in candies marketed in Mexico, *Spectrochimica Acta Part B* 65 (2010) 499-503.
61. Flores, E. M. M., Barin, J. S., Mesko, M. F., Knapp, G., Sample preparation methods based on combustion reactions in closed vessels – a brief overview and recent applications, *Spectrochimica Acta Part B* 62 (2007) 1051-1064.

62. Barin, J. S., Determinação de metais e não metais em produtos farmacêuticos após decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por microondas, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2003.
63. Mesko, M. F., Combustão iniciada por microondas em sistema fechado para decomposição de amostras biológicas, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2004.
64. Moraes, D. P., Decomposição de elastômeros por combustão iniciada por microondas em sistema fechado, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2006.
65. Duarte, F. A., Pereira, J. S. F., Barin, J. S., Mesko, M. F., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Knapp, G., Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 224-227.
66. Nam, K. H., Isensee, R., Infantino, G., Putyera, K., Wang, X., Microwave-induced combustion for ICP-MS: a generic approach to trace elemental analyses of pharmaceutical products, *Spectroscopy* 26 (2011) 36-41.
67. Muller, A. L. H., Muller, C. C., Lyra, F., Mello, P. A., Mesko, M. F., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Determination of toxic elements in nuts by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion, *Food Analytical Methods* 6 (2012) 258-264.
68. Gouveia, S. T., Silva, F. V., Costa, L. M., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A., Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, *Analytica Chimica Acta* 445 (2001) 269-275.
69. Montaser, A., Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, John Willey & Sons, New York, 1998, 1004p.
70. Cetac Technologies, Ultrasonic Nebulizer U-6000T⁺, Operator's Manual, USA.

71. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. IV Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 5ª ed. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria dos Serviços Especializados, São Paulo, 2005.
72. Iyengar, G. V., Subramanian, K. S., Woittiez, J. R. W., Element analysis of biological samples – principles and practice, CRC Press, Boca Raton, 1997, 104-105.
73. Jorhem, L., Dry ashing, sources of error, and performance evaluation in AAS, *Mikrochimica Acta* 119 (1995) 211-218.
74. Hoenig, M., Baeten, H., Vanhentenrijk, S., Vassileva, E., Quevauviller, P., Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods, *Analytical Chimica Acta* 358 (1998) 85-94.
75. Cabon, J. Y., Le Bihan, A., Interference of salts on the determination of lead by electrothermal atomic spectrometry - ion chromatographic study, *Spectrochimica Acta Part B* 51 (1996) 619-631.
76. Evans, E. H., Giglio, J. J., Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8 (1993) 1-18.
77. Grotti, M., Leardi, R., Frache, R., Combined effects of inorganic acids in inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 57 (2002) 1915-1924.
78. Jarvis, K. E., Gray, A. L., Houk, R. S., Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Blackie & Son, Glasgow, 1992, 380p.
79. Maichin, B., Zischka, M., Knapp, G., Pressurized wet digestion in open vessels, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 (2003) 715-720.
80. Mesko, M. F., Moraes, D. P., Barin, J. S., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M., Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.
81. Mello, P. A., Pereira, J. S. F., Moraes, D. P., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Knapp, G., Nickel, vanadium and sulfur determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry in crude oil distillation residues after microwave-induced combustion, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 911-916.

82. Pereira, J. S. F., Pereira, L. S. F., Schmidt, L., Moreira, C. M., Barin, J. S., Flores, E. M. M., Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion, *Microchemical Journal* 109 (2012) 29-35.
83. Mora, J., Maestre, S., Hernandis, V., Todolí, J. L., Liquid sample introduction in plasma spectrometry, *Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 123-132.
84. Asfaw, A., Beauchemin, D., Improvement of the capabilities of inductively coupled plasma optical emission spectrometry by replacing the desolvation system of an ultrasonic nebulization system with a pre-evaporation tube, *Spectrochimica Acta Part B* 65 (2010) 376-384.
85. Asfaw, A., MacFarlane, W. R., Beauchemin, D., Ultrasonic nebulization with an infrared heated pre-evaporation tube for sample introduction in ICP-OES: application to geological and environmental samples, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1254-1263.
86. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS part II: sample introduction system, Tutorial, 2001.
87. Lara, R., Cerutti, S., Salonia, J. A., Olsina, R. A., Martinez, L. D., Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES, *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005) 293-297.
88. Taylor, H. E., Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: practices and techniques, Academic Press, London, 2001, 20-23.
89. Rocha, M. S., Mesko, M. F., Silva, F. F., Sena, R. C., Quaresma, M. C. B., Araújo, T. O., Reis, L. A., Determination of Cu and Fe in fuel ethanol by ICP OES using direct sample introduction by an ultrasonic nebulizer and membrane desolvator, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 456-461.
90. Todolí, J. L., Gras, L., Hernandis, V., Mora, J., Elemental matrix effects in ICP AES, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 142-169.
91. Brenner, I. B., Zischka, M., Maichin, B., Knapp, G., Ca e Na interference effects in an axially viewed ICP using low and high aerosol loadings, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1257-1264.

-
92. Burnecka, J. B., Lesniewicz, A., Zymicki, W., Comparison of pneumatic and ultrasonic nebulizations in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry - matrix effects and plasma parameters, *Spectrochimica Acta Part B* 61 (2006) 579-587.
 93. Bentlin, F. R. S., Pozebon, D., Direct determination of lanthanides in environmental samples using ultrasonic nebulization and ICP OES, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21 (2010) 627-634.
 94. Richter, M., Lannes, S. C., Ingredientes usados na indústria do chocolate, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43 (2007) 357-369.

Tabela A1. Condições selecionadas para avaliação da temperatura do tubo em U e temperatura do condensador do USN-ICP-OES.

Experimento	Temperatura do tubo em U (°C)	Temperatura do condensador (°C)
1	120	-5
2	120	-2,5
3	120	0
4	130	-5
5	130	-2,5
6	130	0
7	140	-5
8	140	-2,5
9	140	0
10	150	-5
11	150	-2,5
12	150	0
13	160	-5
14	160	-2,5
15	160	0

Tabela A2. Limites de detecção ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidos pelos métodos de preparo utilizados após a determinação por ICP-MS, PN-ICP-OES e USN-ICP-OES.

Método	Cd			Co			Cr		
	ICP-MS	PN-ICP-OES	USN-ICP-OES	ICP-MS	PN-ICP-OES	USN-ICP-OES	ICP-MS	PN-ICP-OES	USN-ICP-OES
Via seca	0,0001	0,04	0,002	0,0002	0,06	0,006	0,0010	0,06	0,011
Bloco	0,0004	0,05	0,004	0,0004	0,22	0,012	0,0003	0,09	0,014
MAWD 1	0,0003	0,20	0,010	0,0003	0,23	0,021	0,0031	0,15	0,033
MAWD 2	0,0012	0,18	0,010	0,0005	0,28	0,017	0,0103	0,13	0,039
MAWD 3	0,0003	0,05	0,006	0,0003	0,21	0,014	0,0029	0,12	0,019
MAWD 4	0,0007	0,12	0,022	0,0011	0,22	0,022	#	0,11	0,044
SRC MAWD	0,0016	0,13	nd	0,0013	0,23	nd	0,0073	0,18	nd
MIC HNO ₃ 4 mol L ⁻¹	0,0012	0,10	0,006	0,0004	0,11	0,011	0,0022	0,13	0,018
MIC HNO ₃ 7 mol L ⁻¹	0,0007	0,13	0,005	0,0002	0,12	0,008	0,0072	0,13	0,018
MIC HNO ₃ 10 mol L ⁻¹	0,0006	0,13	0,009	0,0006	0,12	0,011	0,0071	0,14	0,019
MIC HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹	0,0004	0,16	0,004	0,0009	0,14	0,015	0,0066	0,16	0,022

Método	Ni			Pb		
	ICP-MS	PN-ICP-OES	USN-ICP-OES	ICP-MS	PN-ICP-OES	USN-ICP-OES
Via seca	0,005	0,08	0,01	0,0002	0,32	0,05
Bloco	0,006	0,17	0,01	0,0004	1,04	0,10
MAWD 1	0,009	0,54	0,02	0,0037	1,67	0,16
MAWD 2	0,005	0,40	0,03	0,0010	1,87	0,14
MAWD 3	0,003	0,12	0,02	0,0005	1,01	0,07
MAWD 4	0,014	3,99	0,14	0,0042	2,93	0,10
SRC MAWD	0,012	0,46	nd	0,0029	1,37	nd
MIC HNO ₃ 4 mol L ⁻¹	0,062	0,70	0,06	0,0070	1,23	0,11
MIC HNO ₃ 7 mol L ⁻¹	0,021	0,63	0,06	0,0025	1,35	0,14
MIC HNO ₃ 10 mol L ⁻¹	0,016	0,27	0,03	0,0040	1,05	0,10
MIC HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹	0,015	0,61	0,09	0,0219	1,17	0,11

nd: não determinado em função da indisponibilidade do equipamento de SRC MAWD para completar as análises

#: não foi possível efetuar a determinação em função de interferências poliatômicas

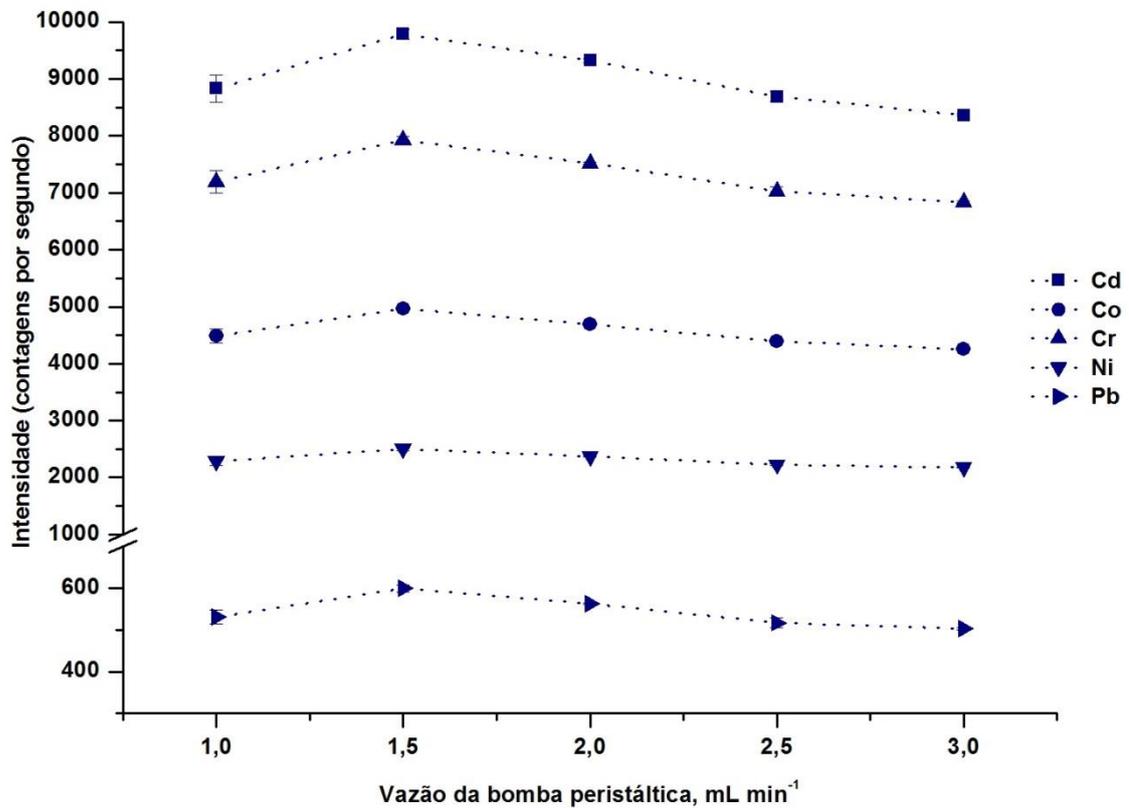


Figura A1. Avaliação da vazão da bomba peristáltica para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por USN-ICP-OES.

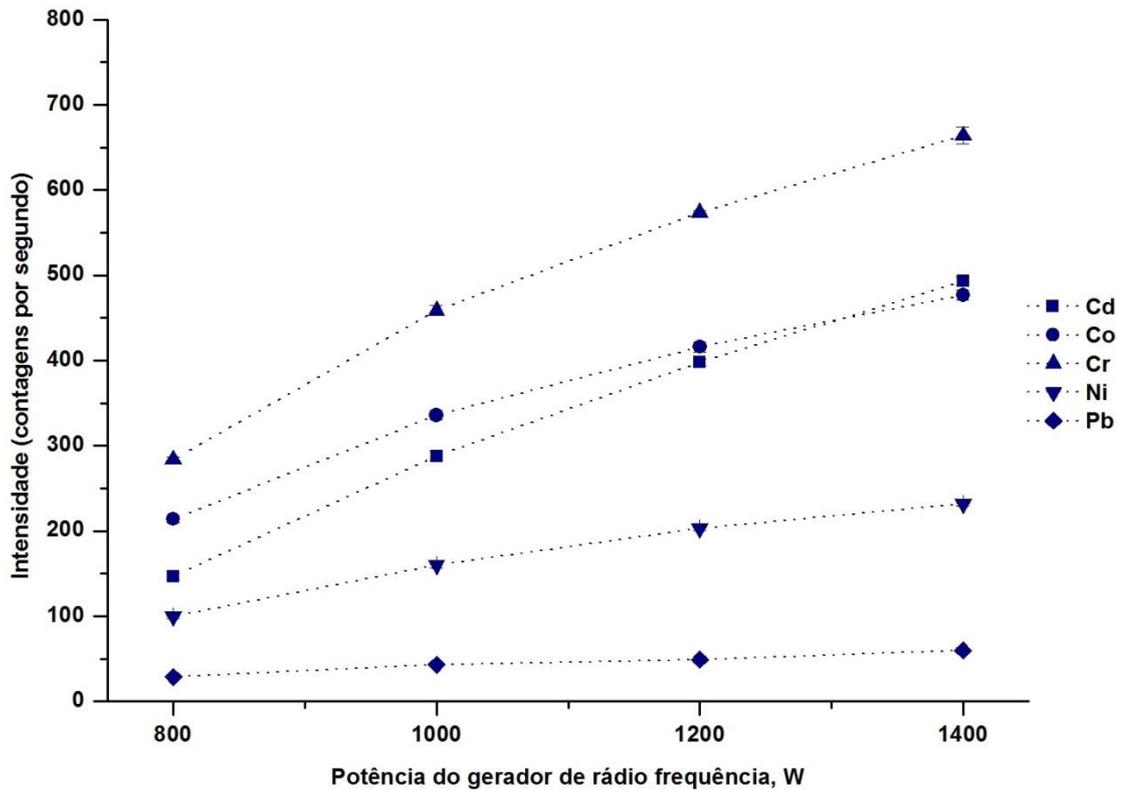


Figura A2. Avaliação da potência do gerador de rádio frequência para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por USN-ICP-OES.

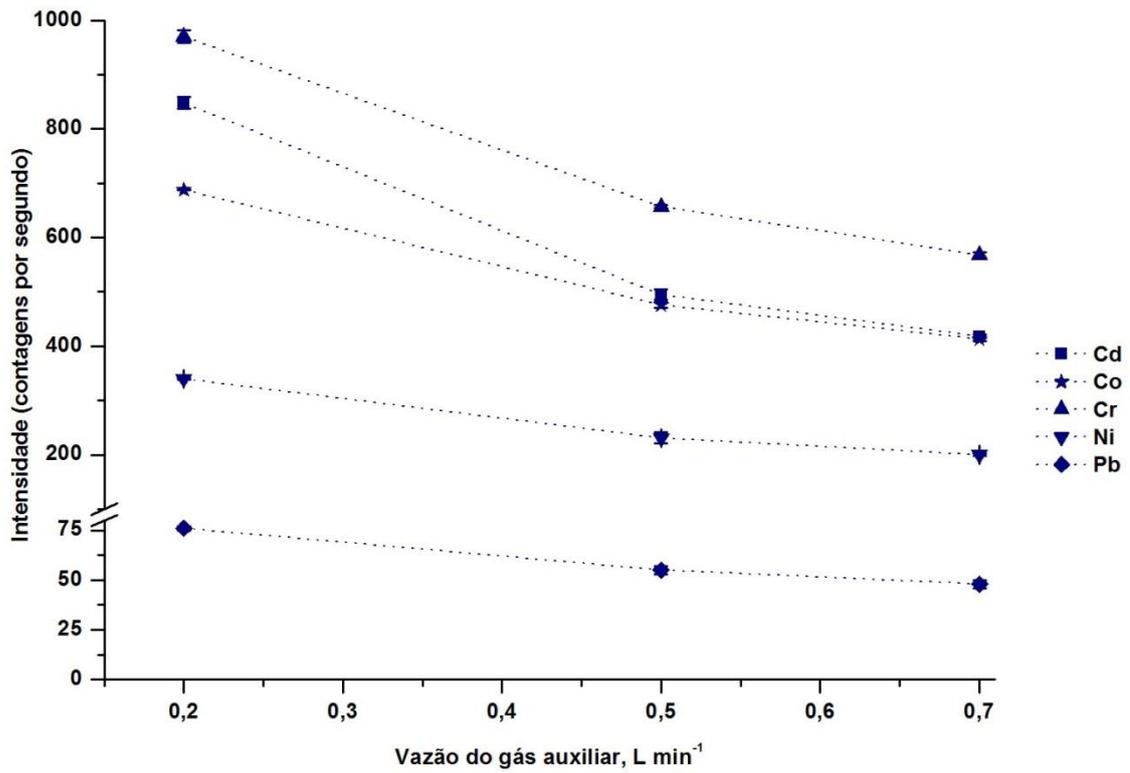


Figura A3. Avaliação da vazão do gás auxiliar para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por USN-ICP-OES.

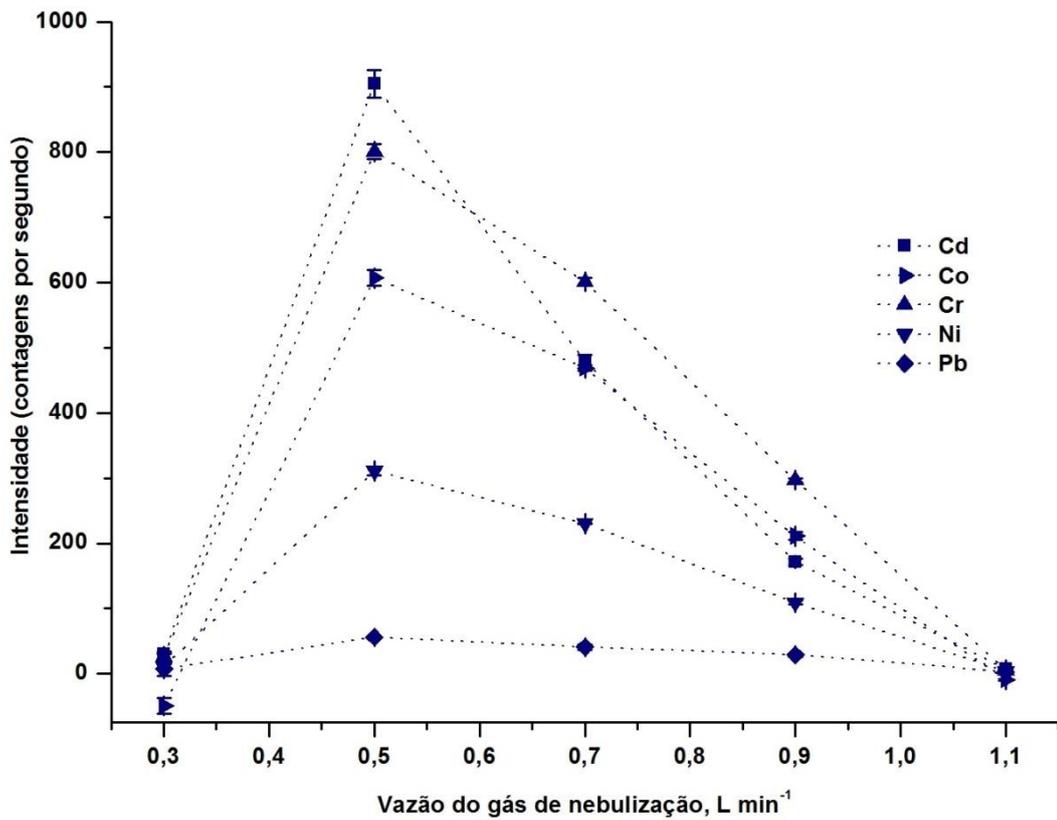


Figura A4. Avaliação da vazão do gás de nebulização para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por USN-ICP-OES.

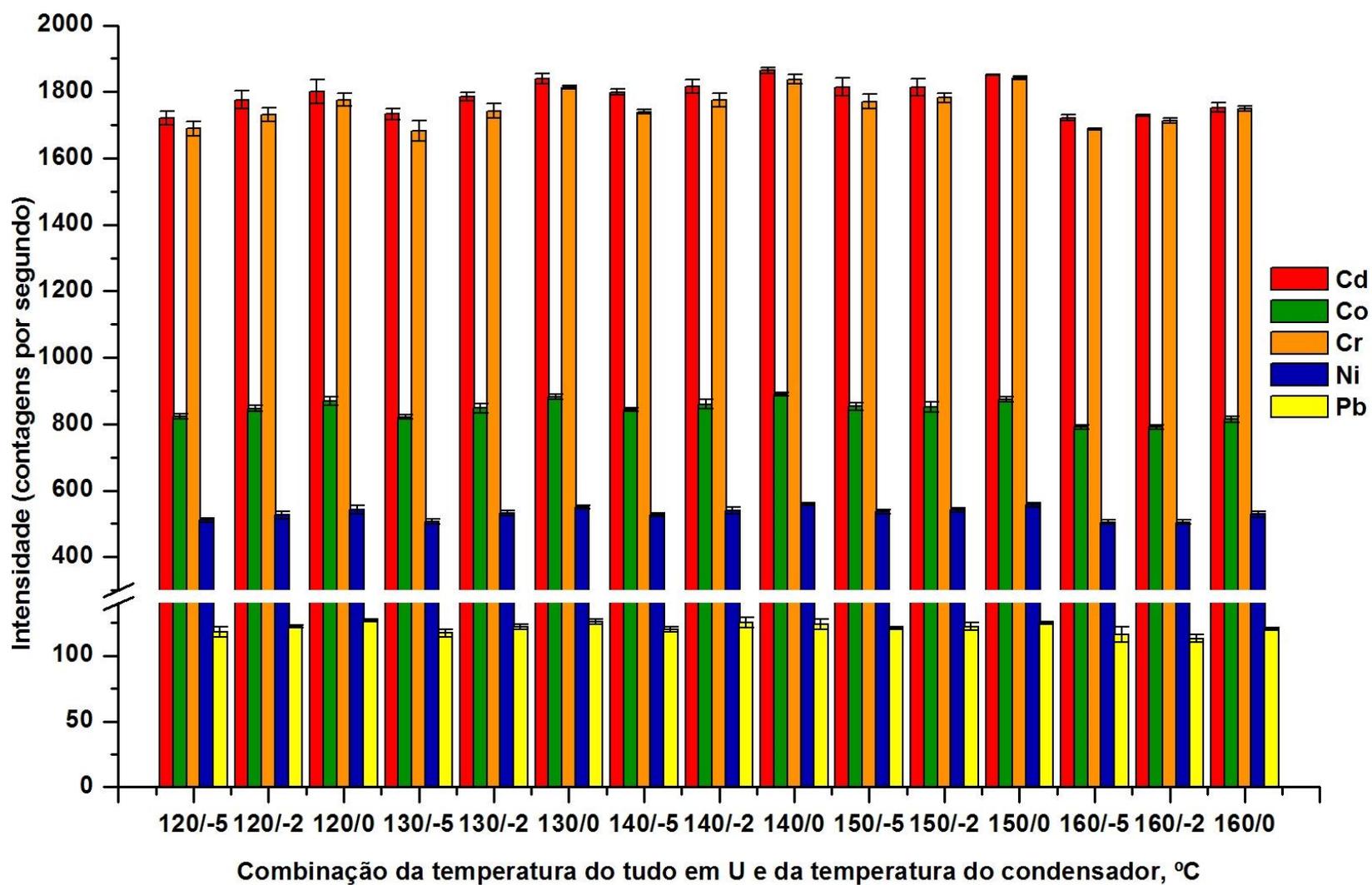


Figura A5. Avaliação da temperatura do tubo em U e a temperatura do condensador para Cd, Co, Cr, Ni e Pb por USN-ICP-OES.