



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

**SISTEMAS EMULSIONADOS PARA ANÁLISE DE  
AMOSTRAS COM ALTO TEOR LIPÍDICO POR  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

TESE DE DOUTORADO  
PPGQ

**Carine Viana Silva leggli**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

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

**SISTEMAS EMULSIONADOS PARA ANÁLISE DE  
AMOSTRAS COM ALTO TEOR LIPÍDICO POR  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.**

elaborada por

***Carine Viana Silva leggli***

TESE DE DOUTORADO

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Bohrer do Nascimento (UFSM-Orientadora)

---

Prof. Dr. Reinaldo Calixto de Campos (PUC RJ)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Goreti R. Vale (UFRGS)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Emanuelli (UFSM)

---

Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa (UFSM)

Santa Maria, 11 de junho de 2010

“Dedico esta tese as estrelas da minha vida, que eles sempre saibam do meu amor único, incondicional e eterno”.

## AGRADECIMENTOS

À professora Denise Bohrer agradeço a confiança, a orientação e por todo o conhecimento científico transmitido. Entretanto, acima de tudo obrigada pela amizade, carinho, apoio e compreensão. Para mim será sempre um exemplo de pessoa, educadora, mãe e mulher.

Ao professor Paulo Cícero do Nascimento agradeço pela amizade e digo que foi uma convivência realmente gratificante e agradável. Deixo aqui uma homenagem a sua trajetória como professor e profissional.

A professora Simone Gonçalves Cardoso agradeço pela orientação de mestrado, pois os conhecimentos gerados foram importantes para a realização desta tese. Agradeço a amizade, o incentivo e o apoio sempre a mim dedicados.

A amiga Claudia Wolmann de Carvalho pela convivência amiga dentro e fora do laboratório, pelas muitas conversas, muitos chimarrões, muita lamentação, muita risada, enfim, pelo companheirismo que é tão essencial numa jornada longa como esta.

As amigas e colegas de laboratório Marlei, Simone, Vanessa, Sandra, Cristiane, Denise e Raquel, que conviveram comigo com maior proximidade e me transmitiram sempre carinho, amizade, companheirismo e alegria.

A toda equipe do Lachem pelo convívio agradável e inesquecível.

Ao Adriano, a minha família, aos meus amigos e aqueles sempre torcem por mim e que, direta ou indiretamente, contribuem para que meus objetivos sejam atingidos.

Em especial, agradeço aos meus filhotes Pedro Henrique e Bernardo pela paciência, compreensão, carinho e amor.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

À Deus, por mais esta grande conquista.

# **RESUMO**

## **Tese de Doutorado**

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

## **SISTEMAS EMULSIONADOS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS COM ALTO TEOR LIPÍDICO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.**

AUTORA: Carine Viana Silva leggli

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Bohrer do Nascimento

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de junho de 2010

Cresce a atenção para o conhecimento do perfil nutricional e toxicológico dos alimentos. Assim, métodos que permitam a determinação de componentes desejáveis ou necessários, como os elementos essenciais, e de indesejáveis como metais pesados são necessários. A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) é uma técnica robusta e bastante estabelecida para a determinação de vários elementos nos mais variados tipos de amostras.

Análises espectrométricas geralmente são feitas em soluções obtidas pelo processo de decomposição ou digestão da amostra original. Entretanto, tais procedimentos implicam em passos adicionais, que podem levar a inconvenientes como contaminação, perdas durante manipulação e a maiores tempos de análise. Sistemas emulsionados têm sido utilizados no preparo de amostras e, como alguns alimentos apresentam alta fração lipídica, esta pode ser uma alternativa conveniente. Com a emulsificação direta com surfactantes não há necessidade de digestão da matéria orgânica e, além disso, permite reduzir o conteúdo final de matéria orgânica e estabilizar o conteúdo oleoso presente.

Desenvolveram-se sistemas emulsionados para determinar diversos metais por AAS em amostras de ovos de galinhas, chocolates, óleo de arroz, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de soja, azeite de oliva, margarina light, margarina e manteiga.

Os tensoativos utilizados neste trabalho foram Triton X100, Triton 114 e Tween 80. Componentes oleosos adicionais, o estearato de octila e o óleo de milho, foram utilizados para melhorar a estabilidade das emulsões de ovos e de chocolate.

Todas as emulsões foram preparadas usando uma seqüência específica para garantir a sua estabilidade e um procedimento geral de preparo das emulsões pode ser alcançado: as alíquotas de surfactante, amostra oleosa ou componente oleoso, quando for o caso, são pesadas e colocadas em béqueres de 80 mL; água aquecida é adicionada sob agitação contínua, para que ocorra o emulsionamento da amostra, adicionando-se água até completar o volume final. Agitação magnética deve ser mantida durante o arrefecimento.

Nas amostras de ovos emulsionados foram determinados de selênio por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) e sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco e ferro por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS). A exatidão dos métodos foi avaliada pela análise do Material de Referência Certificado (MRC) Whole Egg Powder (NIST RM 8415). A recuperação para o Se correspondeu a 95,2% do valor certificado e para os demais metais as recuperações dos valores certificados variaram de 97,5% para magnésio e 102,2% para sódio. Os métodos mostraram adequada sensibilidade, precisão e exatidão.

Sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco e ferro foram determinados por F AAS em amostras de chocolate emulsionadas e micro-emulsões foram aplicadas para determinar alumínio, cobre e manganês por GF AAS. Baking Chocolate (SRM 2384) foi utilizado para realizar a validação dos métodos e as recuperações dos valores certificados variaram de 88,6% para potássio a 108% para o manganês.

Nas amostras emulsionadas de óleos vegetais, margarina e manteiga, puderam ser determinados As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb por GF AAS e Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe por FAAS. Para cada caso as condições de medida e os parâmetros operacionais foram otimizados. As recuperações variaram entre 90% (Na) a 112% (Fe) para as medidas por F AAS e entre 83% (Cd) a 121% (Pb) para as medidas por GF AAS.

Palavras-chave: emulsões, espectrometria de absorção atômica, metais, ovos, chocolates e óleos vegetais.

## **ABSTRACT**

Program Post-Graduate in Chemistry  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

### **EMULSIFIED SYSTEMS FOR THE ANALYSIS OF SAMPLES WITH HIGH FAT CONTENT BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

AUTHOR: Carine Viana Silva leggli  
SUPERVISOR: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Bohrer do Nascimento  
Date and Local of the Defense: Santa Maria, June of 2010.

The attention to the knowledge of nutritional and toxicological profiles of foodstuffs is increasing. Therefore, methods that allow for the determination of components desirable or necessary, as essential elements, and of undesirable as heavy metals are of great importance. Atomic Absorption Spectrometry (AAS) is a robust and well established technique for the determination of several elements in the most varied types of samples.

Spectrometric analyses are usually made with sample solutions obtained by decomposition processes or sample digestion. However, such procedures result in additional steps that can cause inconveniences such as contamination and losses during manipulation. Emulsified systems have been used in the preparation of samples with high fat content. Emulsifying makes the sample decomposition not necessary, allows reducing the final content of organic matter, and stabilizes the present oily content.

In this work, emulsified systems were developed to measure several metals by AAS in samples such as chicken eggs, chocolates, rice oil, canola oil, sunflower oil, corn oil, soy oil, olive oil, margarine light, margarine and butter.

The tensoactives used in this work were Triton X100, Triton 114 and Tween 80. Additional oily components, the octila estearato and the corn oil, were used to get better in the stability of the chocolate and egg emulsions.

All of the emulsions were prepared using a specific sequence to guarantee the stability and a general procedure of emulsion preparation can be established: to weigh the surfactant, oily sample or additional oily component, when it is the case, and to put in beakers of 80 mL. Adding heated water under continuous agitation to happen the sample emulsification, after following adding water until to reach the final volume. Magnetic agitation should be maintained during the cooling.

In the samples of emulsified eggs were determined Selenium (Se) for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) and sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron for Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). The methods validations were accomplished with the Certified Material of Reference (CRM) Whole Egg Powder (RM 8415). The Se recovery was 95,2% of the certified value and for another metals the recoveries of the certified values varied from 97,5% for magnesium and 102,2% for sodium. The methods showed appropriate sensibility, precision and accuracy.

Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron were determined in chocolate samples emulsified by F AAS and micro-emulsions were applied for the determination of aluminum, copper and manganese by GF AAS. The validation of the method was against SRM Baking Chocolate (SRM 2384) and the recoveries of the certified values varied from 88,6% for potassium to 108% for manganses.

In the emulsified samples of vegetable oils, margarine and butter were determined As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni and Pb by GF AAS and Na, K, Ca, Mg, Zn and Fe for FAAS. And each in case the best measurement conditions were selected and the operational parameters were fit. The results for accuracy with inorganic recovery assays varied among 90% (Na) to 112% (Fe) for the FAAS measurements and among 83% (Cd) to 121% (Pb) for the GFAAS measurements.

keywords: emulsions, atomic absorption spectrometry, metals, eggs, chocolates and edible oils.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Fluxograma sobre a descrição do preparo das amostras emulsionadas para posterior medida por FAAS. O volume final para todos os sistemas foi de 50 mL e água destilada foi utilizada em quantidade suficiente para atingir este volume ...	24
FIGURA 2 -	Fluxograma sobre a descrição do preparo das emulsões e microemulsões das amostras para posterior medida por GF AAS. O volume final para todos os sistemas foi de 50 mL e água destilada foi utilizada em quantidade suficiente para atingir este volume .....	25
FIGURA 3 -	Curvas de pirólise e atomização para Se em água e em emulsão. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1100 °C; volume de Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> = 5 µL; Se = 500 pg .....	58
FIGURA 4 -	Recuperações (%) em diferentes temperaturas de pirólise (°C) para uma amostra de ovo adicionada com Se inorgânico 50 µg L <sup>-1</sup> e com Se-metionina 50 µg L <sup>-1</sup> . Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C. Volume de Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> = 5 µL .....	59
FIGURA 5 -	Curvas de pirólise e atomização para As aquoso. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2400 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1400 °C. Modificadores avaliados: (1) Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 µL) e Ni 50 ppm (10 µL); (2) Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL) e Ni 50 ppm (2 µL); (3): Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL) e (4) Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (3 µL) e Ni 50 ppm (3 µL). As = 2000 pg.	66
FIGURA 6 -	Curvas de pirólise e atomização de emulsão de amostra de azeite de oliva enriquecida com Cd. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 1400 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 900 °C. Modificador 1: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (5 µL); modificador 2: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 µL) e Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 µL); e modificador 3: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL). Cd = 280 pg .....	67
FIGURA 7 -	Curvas de pirólise e atomização para Pb aquoso e Pb em solução contendo 4% de Tween 80. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2100 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 900 °C. Modificador 1: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL); e modificador 2: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 µL) e Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 µL). Pb = 250 pg .....	68

FIGURA 8 -	Curvas de pirólise e atomização para Pb adicionados sobre emulsões de amostras de azeite de oliva e margarina. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2100 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 900 °C. Modificador 1: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL); e modificador 2: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 µL) e Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 µL). Pb na emulsão de margarina = 680 pg. Pb na emulsão de azeite de oliva = 250 pg .....	69
FIGURA 9 -	Curvas de pirólise e atomização de Cu aquoso. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Modificador 1: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL) e Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL); e modificador 2: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL).e ácido ascórbico 2 g% (5 µL). Cu = 250 pg .....	70
FIGURA 10 -	Curvas de pirólise e atomização para Cu adicionados sobre emulsões de amostras de azeite de oliva e margarina. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Modificador 1: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL) e Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL); e modificador 2: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL).e ácido ascórbico 2 g% (5 µL). Cu = 250 pg .....	71
FIGURA 11 -	Curvas de pirólise e atomização para Cr adicionados sobre emulsões de amostras de azeite de oliva e margarina. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Modificador 1: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL) e Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL); e modificador 2: Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL).e ácido ascórbico 2 g% (5 µL). Cu = 250 pg. Cr = 1000 pg .....	72
FIGURA 12 -	Curvas de pirólise e atomização para Mn adicionados sobre emulsões de amostras de margarina e de azeite de oliva. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2400 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1400 °C. As curvas foram construídas sem modificador e com o uso de Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5 µL) como modificador químico. Mn = 500 pg .....	73
FIGURA 13 -	Curvas de pirólise e atomização para Ni adicionados sobre emulsões de amostras de margarina e de azeite de oliva, sem o uso de modificador químico. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2500 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Ni=500 pg .....	74
FIGURA 14 -	Curvas de pirólise e atomização para Al em emulsão. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2600 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1300 °C; volume dos modificadores Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> = 3 µL e Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> = 3 µL. Al = 1430 pg .....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Variáveis e níveis do planejamento factorial $2^3$ para preparação das emulsões .....	26
TABELA 2 -	Composição das formulações otimizadas e metais capazes de serem determinados em cada uma das formulações .....	29
TABELA 3 -	Níveis de concentração dos metais ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nos óleos e surfactantes usados neste estudo.....	30
TABELA 4 -	Parâmetros instrumentais para determinação dos metais .....	38
TABELA 5 -	Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metais em amostras de ovo emulsionadas....	40
TABELA 6 -	Precisão do método proposto para os metais selecionados e exatidão avaliada usando material de referência certificado (Egg whole powder, NIST RM 8415).....	41
TABELA 7 -	Níveis de concentração dos metais ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{DP}$ , $n=6$ ) nas amostras de ovos.....	42
TABELA 8 -	Quantidade de amostra de chocolate e composição das formulações otimizadas para a determinação dos metais por FAAS.....	44
TABELA 9 -	Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metais em amostras de chocolate emulsionadas.....	45
TABELA 10 -	Determinação dos analitos no material de referência certificado Baking Chocolate (NIST SRM 2384) e dados da precisão do método.....	46
TABELA 11 -	Níveis de concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{DP}$ , $n=3$ ) em diferentes amostras de chocolate.....	48
TABELA 12 -	Percentual da Ingestão Diária Recomendada provida por uma porção de 25g dos chocolates analisados.....	49
TABELA 13 -	Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metal em amostras emulsionadas por F AAS.	52

TABELA 14 -	Resultados da recuperação dos analitos nas amostras adicionadas.....	53
TABELA 15 -	Níveis de concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de óleos e gorduras comestíveis .....	55
TABELA 16 -	Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura/ tempo para determinação de Se nas amostras de ovos emulsionadas .....	60
TABELA 17 -	Características de desempenho do método para determinação de Se em amostras de ovos emulsionadas por GF AAS .....	62
TABELA 18 -	Determinação de Se em ovos oriundos de galinhas tratadas com suplementação de Se .....	63
TABELA 19 -	Parâmetros instrumentais para a determinação de metais por GF AAS nas amostras emulsionadas .....	75
TABELA 20 -	Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metais em amostras emulsionadas por GF AAS .....	76
TABELA 21 -	Resultados da recuperação ( $\% \pm\text{DP}$ , $n=3$ ) dos analitos nas amostras adicionadas .....	77
TABELA 22 -	Níveis de concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de óleos e gorduras comestíveis .....	79
TABELA 23 -	Condições analíticas para determinação de metais em amostras de chocolate por GFAAS .....	82
TABELA 24 -	Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metal em amostras emulsionadas .....	83
TABELA 25 -	Determinação dos analitos em materiais de referência certificada .....	84
TABELA 26 -	Resultados de recuperação ( $\% \pm\text{DP}$ , $n=3$ ) dos analitos nas amostras adicionadas .....	84
TABELA 27 -	Níveis de concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$ , $n=3$ ) em amostras de chocolate .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água-óleo
ANOVA	Análise de Variância
c0	Concentração característica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTAB	Brometo de cetil trimetilamonio
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EPN	Extração em ponto de nuvem
EQR	Estimativa da Quantidade Requerida
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Chama
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite
HG AAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos
I	Corrente
IA	Ingestão adequada
ICP	Inductively coupled plasma
IDR	Ingestão diária recomendada
IEE	Índice de Estabilidade da Emulsão
IST	Ingestão superior tolerável
LOD	Limite de detecção
m0	Massa característica
mA	Mili ampére
MRC	Material de Referência Certificado
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanômetro
O/A	Óleo-água
ppb	Partes por bilhão

RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STPF	Stabilized temperature platform furnace
TIF	Temperatura de Inversão de Fases

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>SUMÁRIO</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>2.1 Emulsões e micro emulsões</b> .....	3
2.1.1 A escolha do tensoativo .....	4
2.1.2 A formação de emulsões e microemulsões.....	5
2.1.3 Estabilidade das emulsões.....	6
<b>2.2 Espectrometria de absorção atômica</b> .....	7
2.2.1 Atomização em chama.....	8
2.2.2 Atomização em forno de grafite.....	9
2.2.2.1 Modificadores químicos.....	11
2.3.3 Interferências em AAS.....	13
2.3.3.1 Interferências em F AAS.....	13
2.3.3.2 Interferências em GF AAS.....	15
<b>2.3 Uso de emulsões na determinação de metais por espectrometria de absorção atômica</b> .....	15
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3.1 Objetivos gerais</b> .....	19
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	19

<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
<b>4.1 Instrumentação</b> .....	21
<b>4.2 Reagentes</b> .....	22
<b>4.3 Amostras</b> .....	23
<b>4.4 Controle da contaminação</b> .....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>5.1 Sistemas emulsionados</b> .....	24
5.1.1 Procedimento geral de preparo dos sistemas emulsionados .....	24
5.1.2 Preparo das emulsões para determinações por AAS .....	24
5.1.3 Planejamento experimental .....	26
5.1.4 Determinação da estabilidade .....	26
5.1.5 Viscosidade .....	26
5.1.6 Resultados e discussão .....	27
5.1.6.1 Estudos de formulação .....	28
5.1.6.2 Formação e estabilização da emulsão .....	30
5.1.6.3 Emulsões das amostras .....	32
a) <i>Emulsões de ovos:</i> .....	32
b) <i>Emulsões de chocolate</i> .....	34
c) <i>Emulsões de óleos vegetais, margarinas e manteigas</i> .....	35
<b>5.2 Determinações de metais por FAAS</b> .....	36
5.2.1 Parâmetros instrumentais .....	37
5.2.2 Análise de amostras de ovos emulsionadas .....	38
5.2.2.1 Desenvolvimento do método .....	39
5.2.2.2 Aplicação em amostras reais .....	42
5.2.3 Análise de amostras de chocolates emulsionadas .....	43
5.2.3.1 Desenvolvimento do método .....	43
5.2.3.2 Aplicação em amostras reais .....	47
5.2.4 Análise das amostras de óleos margarinas e manteigas .....	51
5.2.4.1 Desenvolvimento do método .....	51
5.2.4.2 Aplicação em amostras reais .....	54
<b>5.3 Determinações de metais por GFAAS</b> .....	56
5.3.1 Determinação de Se em ovos .....	56



5.3.1.1 Desenvolvimento do método .....	57
a) Determinação das condições analíticas .....	57
b) Características de desempenho do método .....	60
5.3.1.2 Aplicação em amostras reais .....	62
5.3.2 Determinação de elementos traços em óleos vegetais, margarina e manteiga por GF AAS .....	64
5.3.2.1 Desenvolvimento do método .....	65
a) Determinação das condições analíticas .....	65
b) Características de desempenho do método .....	76
5.3.2.2 Aplicação em amostras reais .....	78
5.3.3 Determinação de alumínio, cobre e manganês em amostras de chocolate micro emulsionadas por GF AAS .....	80
5.3.3.1 Desenvolvimento do método .....	80
a) Determinação das condições analíticas .....	80
b) Características de desempenho do método .....	82
5.3.3.2 Aplicação em amostras reais .....	84
<b>5.4 Considerações finais .....</b>	<b>84</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>99</b>

# 1 INTRODUÇÃO

---

Para a quantificação dos componentes majoritários em alimentos, como proteínas, gorduras e açúcares, existe uma literatura tradicional e métodos oficiais. Mais recentemente, passou a haver uma preocupação com os componentes presentes em menores concentrações, mas nem assim menos importantes, como os metais.

Ao mesmo tempo, continua crescendo a atenção para o que os alimentos contêm, não apenas os componentes desejáveis ou necessários, como os elementos essenciais, mas também componentes indesejáveis como metais pesados. Há ainda os elementos que apresentam uma dualidade de classificação: desejáveis até uma certa concentração, por serem essenciais, porém indesejáveis a partir de certo nível, a partir do qual se tornam tóxicos. E, quanto mais estreita esta fronteira, maior a responsabilidade do analista.

Além dos fatores nutricionais e toxicológicos, o controle de metais pesados em alimentos é de grande importância para a comercialização, exportação e importação de alimentos. Os níveis destes elementos devem atender aos limites estabelecidos pelas normas e legislações.

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica bem estabelecida e é amplamente utilizada para a determinação de vários elementos nos mais variados tipos de amostras. Embora as amostras possam ser analisadas na forma sólida em alguns modelos de espectrômetros de absorção atômica, tradicionalmente as análises são feitas com soluções da amostra. Estas soluções são normalmente obtidas pelo processo de decomposição ou digestão, os quais podem ser efetuados de diversas maneiras. Entretanto, tais procedimentos resultam em passos adicionais que podem levar a inconvenientes como erros de amostragem, contaminação e perdas durante a manipulação, além do aumento do tempo de análise.

Devido à complexidade da sua constituição orgânica, os alimentos muitas vezes são considerados matrizes difíceis de serem analisadas. Outra questão relevante é que certos tipos de alimentos contêm uma concentração muito alta de componentes oleosos normalmente mais refratários aos procedimentos de

dissolução. Nestes casos, a emulsificação direta com surfactantes é uma alternativa interessante para o preparo da amostra.

As vantagens atribuídas ao uso de emulsões no preparo de amostras lipídicas residem no fato de que não há necessidade de digestão da matéria orgânica ou o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos. Inclusive o uso de emulsões pode reduzir o conteúdo final de matéria orgânica para valores abaixo de 5%. Quando um óleo é disperso em água, o sistema obtido apresenta um comportamento similar ao de uma solução aquosa, permitindo assim realizar a calibração com soluções de padrões aquosos. Outra vantagem além da redução do conteúdo orgânico da amostra, é que a emulsificação da amostra reduz a sua viscosidade, mantendo a homogeneidade e estabilidade do sistema, tornando-se adequado para ser analisado por AAS.

Este trabalho surgiu da necessidade e carência de métodos disponíveis na literatura para determinação de selênio em amostras de ovos de galinha. Como o ovo é um sistema naturalmente emulsionado pelos seus componentes, investigou-se a possibilidade desta amostra ser preparada na forma de uma emulsão para posterior análise por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS). O que era uma alternativa promissora permitiu, então, a determinação do selênio em amostras de ovos de galinhas por GF AAS. Com a evolução da pesquisa avaliou-se a possibilidade das emulsões serem utilizadas para outras amostras também com alto teor lipídico.

Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (F AAS) foi utilizada para determinar Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe em ovos de galinha, chocolates, óleos vegetais, azeites, margarinas e manteiga. Através da técnica de GF AAS foram determinados Se em ovos de galinhas; Al, Mn e Cu em chocolates; e Cr, Ni, As, Pb, Cd, Cu e Mn em óleos vegetais, azeites, manteigas e margarinas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Emulsões e micro emulsões

Quando dois líquidos imiscíveis são agitados mecanicamente, no início ambas as fases tendem a formar gotículas. Quando cessa a agitação, as gotículas coalescem rapidamente e os dois líquidos separam-se. Este processo é espontâneo, porém a estabilidade da estrutura em gotículas pode ser aumentada com a adição de um tensoativo (LACHMAN et al., 2001).

Agentes tensoativos (também chamados surfactantes, agentes emulsificantes, emulsionantes ou emulsificadores) são moléculas ou íons que são adsorvidos nas interfaces (THOMPSON, 2006). Os tensoativos contêm moléculas com afinidade tanto pela água como pelo óleo, ou seja, com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Estes compostos possuem duas funções principais na formação de emulsões: (1) se orientar na interface, diminuindo a tensão interfacial entre o óleo e a água, permitindo a formação da emulsão sem muito gasto de energia e (2) formar um filme ou barreira ao redor das gotículas, estabilizando a fase dispersa frente a coalescência (PRISTA et al., 2003).

Emulsão é um sistema de duas fases (óleo/água) onde uma das fases está dispersa na forma de gotas na outra. A fase que está presente na forma de gotas é referenciada como fase dispersa ou fase interna e a fase que forma a matriz na quais tais gotas estão em suspensão é chamada de fase contínua ou fase externa (LACHMAN et al., 2001). As emulsões consistem de sistemas inerentemente instáveis (AULTON, 2005).

Diferentemente das emulsões, as microemulsões podem ser definidas, de forma geral, como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, opticamente transparentes, de baixa viscosidade e que contêm uma pseudo-fase, ou seja, uma fase dispersa constituída por gotículas de tamanho nanométrico em uma fase contínua, formando um sistema micro-heterogêneo, apesar de visualmente homogêneo (AULTON, 2005; MENDONÇA, 2005).

Os dois tipos principais de emulsões e microemulsões são óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). No primeiro, o óleo está disperso como gotículas em uma fase aquosa, é o tipo mais comumente utilizado. O segundo tipo compreende partículas de água dispersas como gotículas em um óleo. O que determina o tipo de emulsão/microemulsão são, portanto, o tipo de emulsionante e a quantidade relativa de cada fase (THOMPSON, 2006).

As principais propriedades desejáveis de uma emulsão para fins analíticos são ter baixa viscosidade e ser cineticamente estável por um tempo suficiente para ocorrer a análise. Estas características podem ser alcançadas com um planejamento experimental adequado para a correta escolha da formulação e do procedimento de preparação.

### **2.1.1 A escolha do tensoativo**

A escolha do sistema emulsionante mais adequado para uma determinada emulsão requer certa experiência, dada a ampla variedade de agentes emulsionantes atualmente disponíveis e, evidentemente, a escolha final dependerá das propriedades e do uso pretendido. A decisão de formular uma emulsão O/A ou A/O já permitirá descartar uma série de sistemas emulsionantes inadequados (AULTON, 2005). Para fins analíticos o tipo de emulsão mais adequado é O/A por serem geralmente mais estáveis e apresentarem uma menor viscosidade, além de tenderem a se comportar conforme a fase externa aquosa, permitindo muitas vezes o uso de soluções de calibração aquosas.

Para auxiliar na escolha do tensoativo ideal para cada formulação foi desenvolvido por Griffin o sistema EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo). Ele baseia-se no fato de todos os tensoativos apresentarem uma porção hidrófila e outra lipófila. O equilíbrio entre as partes varia de acordo com o tensoativo. Com base neste equilíbrio, foram atribuídos valores de 1 a 20 para os tensoativos, sendo os menores valores para os mais lipofílicos. Como regra geral, agentes emulsionantes nos quais os grupos hidrofílicos são relativamente dominantes são os mais adequados para produzir emulsões O/A (THOMPSON, 2006).

Os tensoativos não iônicos sintéticos são ésteres complexos e ésteres-éteres, derivados dos polióis, óxidos de alquilenos, ácidos graxos e alcoóis graxos. A porção

hidrofílica dessas moléculas consiste em hidroxilas livres e grupos óxidos de etileno. A parte lipofílica apresenta longas cadeias hidrocarbonadas de ácidos graxos e álcoois graxos. São compostos neutros, estáveis em uma ampla faixa de pH, relativamente insensíveis à presença de altas concentrações de eletrólitos, estáveis ao aquecimento e não aumentam a viscosidade do sistema (THOMPSON, 2006). Dentro deste grupo estão os tensoativos Tween 80, Triton X 100 e Triton 114.

Quanto à proporção a ser usada de tensoativo, alguns autores recomendam que a quantidade necessária de tensoativo deva depender da quantidade da fase interna a ser emulsionada e neste caso recomendam usar de 10 a 20% (p/V) da fase interna (THOMPSON, 2006). Porém, esta quantidade pode ser determinada experimentalmente através de um planejamento experimental, onde são testadas diferentes quantidades de óleo e tensoativo para determinar a quantidade mínima necessária para ser produzida uma emulsão estável.

### **2.1.2 A formação de emulsões e microemulsões**

A formação espontânea de uma emulsão raramente acontece, requerendo primeiramente, a formação de gotículas da fase interna e, depois, a estabilização destas gotículas na fase externa. Para tal, é necessária a agitação mecânica e a aplicação de energia na forma de calor. O processo inteiro deve ser feito de tal modo que estes dois passos sejam executados antes da fase interna começar a coalescer. A fase de estabilização e a velocidade de coalescência dependem principalmente do tempo de agitação e da temperatura, então, para alcançar uma emulsão estável, estes dois parâmetros devem ser corretamente selecionados e monitorados (LACHMAN et al., 2001).

Na prática a emulsificação é conseguida pelo calor. Porém, as interações são complexas, sendo praticamente impossível prever se um aumento da temperatura irá favorecer a emulsificação ou a coalescência. O aumento da temperatura reduz tensão interfacial, porém o calor também pode favorecer a separação das fases devido à energia cinética aumentada das gotículas (LACHMAN et al., 2001).

Emulsões O/A são muitas vezes preparadas pela técnica de inversão de fases, na qual a fase aquosa é lentamente adicionada à fase oleosa durante a mistura. Assim, no início forma-se uma emulsão A/O, mas à medida que a fase

aquosa continua sendo adicionada, ocorre a inversão da emulsão formando a emulsão O/A pretendida (LACHMAN et al., 2001). Este método frequentemente produz emulsões com tamanho médio de gotícula muito pequeno (AULTON, 2005). Quanto menores as gotículas da fase dispersa, mais lenta será a velocidade de cremagem da emulsão. O tamanho das partículas pode também afetar a sua viscosidade (AULTON, 2005).

A influência mais importante que a temperatura tem sobre a emulsão é provavelmente sobre sua inversão. A temperatura de inversão de fases (TIF) é considerada como a temperatura na qual as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do emulgente se equilibram, é também conhecida como temperatura de EHL. Este fenômeno pode ocorrer durante a formação das emulsões já que são normalmente preparadas em temperaturas elevadas e, em seguida, arrefecidas à temperatura ambiente. A TIF é dependente do tensoativo e da quantidade dele na emulsão.

A duração da agitação, assim como a temperatura, tem uma influência profunda sobre o processo de emulsificação. No período inicial de agitação as gotículas necessárias para o processo de emulsificação são formadas. Porém, se a agitação exceder o período necessário para cisalhamento ideal das gotículas, poderá ocorrer adesão devido à colisão entre as gotículas. Normalmente, este tempo é determinado empiricamente (LACHMAN et al., 2001).

Finalmente, existe uma relação entre a temperatura e a duração de agitação devido ao elevado movimento cinético das moléculas do emulsionante na interface óleo/água. Assim, é necessário manter uma agitação contínua durante o processo de resfriamento, para evitar a demulsificação (AULTON, 2005).

### **2.1.3 Estabilidade das emulsões**

uma emulsão estável pode ser definida como um sistema no qual as gotículas da fase interna retêm suas características iniciais e permanecem uniformemente distribuídas por toda a fase contínua (AULTON, 2005). A manutenção do tamanho das gotículas e da facilidade de redispersão é essencial para a estabilidade física do sistema (THOMPSON, 2006).

A natureza física da barreira interfacial formada pelo tensoativo determina se as gotículas irão coalescer ou não quando se aproximarem. Qualquer agente ou

fator que destrua ou influencie no filme interfacial poderá gerar a quebra da emulsão (separação das fases) (AULTON, 2005). Assim, a estabilidade de uma emulsão, ou sua resistência à quebra, depende de uma série de fatores, tais como o tipo de agente emulsificante, a viscosidade do sistema formado, o peso específico das fases, a concentração, a idade e a quantidade de agitação (SINKO, 2008).

Os mecanismos pelos quais a emulsão pode se tornar instável são: cremagem, floculação e coalescência. A cremagem ocorre sob a influência da gravidade, com as gotículas da emulsão tendendo a se separar do corpo da emulsão, sedimentando ou emergindo, dependendo das diferenças das densidades específicas entre as fases dispersa e dispersante (LACHMAN et al., 2001). A floculação é adesão reversível das gotículas como resultado de forças repulsivas e atrativas entre as fases. Na floculação o filme interfacial e a individualidade das gotículas são mantidos, porém uma rede bidimensional é formada (AULTON, 2005). A coalescência, por ser irreversível, é uma alteração mais profunda que as anteriores. A coalescência é um processo de separação em que as gotículas emulsificadas se unem, formando gotículas maiores, que terminarão por se separarem da fase externa (PRISTA, 2003).

Alguns procedimentos podem ser utilizados para evitar, contornar ou pelo menos minimizar estas instabilidades físicas como: procurar produzir emulsões com tamanho pequeno de gotículas, aumentar a viscosidade da fase contínua, reduzir a diferença de densidade entre as duas fases e controlar a concentração da fase dispersa (AULTON, 2005).

## **2.2 Espectrometria de absorção atômica**

A escolha de uma técnica analítica adequada para a determinação de elementos metálicos em alimentos depende de vários fatores: preparo de amostra, limite de detecção das técnicas disponíveis, precisão, exatidão, faixa de concentração, interferências e tempo de análise.

A espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) é uma das principais ferramentas da química analítica para a quantificação de metais, devido à sua alta sensibilidade e seletividade. É uma



técnica bem estabelecida e bastante utilizada em laboratórios de pesquisa, desenvolvimento e prestação de serviços, sendo capaz de determinar cerca de 70 elementos, em amostras das mais diversas origens em níveis de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (HARRIS, 2001).

A AAS utiliza basicamente o princípio de que átomos livres (estado gasoso) gerados em um atomizador são capazes de absorver radiação de frequência específica, que é emitida por uma fonte espectral; a quantificação obedece, desta forma, os princípios da lei de Beer (SKOOG et al., 1998).

A espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS, do inglês *Grafite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) são técnicas analíticas bem estabelecidas e suficientemente robustas para serem implantadas em laboratórios envolvidos com análises químicas em larga escala. Por outro lado, erros sistemáticos e aleatórios podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados bem como o desempenho das técnicas analíticas em questão (WELZ & SPERLING, 1999).

Em F AAS as alterações que ocorrem na temperatura da chama, na taxa de aspiração da solução, na composição da amostra, entre outras, podem prejudicar os resultados analíticos. Comparada com a FAAS, a GF AAS é substancialmente mais sensível e versátil, devido à configuração do tubo de grafite e ao seu caráter dual: reator químico e atomizador. A técnica GFAAS também é susceptível a alterações instrumentais e operacionais: variações na temperatura e na taxa de aquecimento do tubo de grafite, no volume injetado de amostra, na radiação emitida da fonte, nas diluições, na estrutura do atomizador, são alguns exemplos de parâmetros que podem afetar o desempenho analítico (FERNANDES et al., 2003).

### **2.2.1 Atomização em chama**

A espectrometria de absorção atômica com chama tem sua sensibilidade limitada por fatores como a dispersão dos átomos dos analitos gerados na chama, que passam rápida e continuamente através do caminho ótico durante a aspiração da amostra, e a baixa eficiência do sistema de nebulização pneumático que é de, no máximo, 10%. Porém, é uma técnica consolidada, sendo utilizada para

determinações rotineiras de diversos metais em diversas amostras em função de ser uma técnica amplamente disponível, de baixo custo e fácil manutenção e operação (SKOOG et al., 1998).

Na atomização em chama uma alíquota da solução da amostra é convertida em aerossol no nebulizador e transportada para a chama. O tempo de residência dos átomos livres no caminho óptico é menor devido ao caráter dinâmico da chama, resultando em uma menor sensibilidade (WELZ & SPERLING, 1999). As gotas que entram na chama evaporam e o aerossol sólido resultante também se evapora e se decompõe em átomos. Assim, a chama deve possuir temperatura suficiente não só para vaporizar a amostra, mas também para atomizá-la. A composição química da chama tem influência neste processo (HARRIS, 2001).

Na escolha da chama, os parâmetros mais importantes a serem considerados são a sua temperatura, a velocidade linear de queima e a razão entre o combustível e o oxidante (estequiometria da chama). As combinações mais comuns de oxidante/combustível, empregadas, atualmente, em absorção atômica são ar-acetileno e óxido nitroso-acetileno. A chama de óxido nitroso-acetileno é uma chama redutora utilizada na determinação de elementos com alto ponto de ebulição e/ou que possuem uma forte tendência a formar óxidos refratários, tais como Al, Zr, Cr, Ca, etc. Já, a chama de ar-acetileno é preferencialmente utilizada na determinação de aproximadamente 35 elementos, que conseguem ser bem atomizados na sua temperatura, que é de cerca de 2300°C (WELZ & SPERLING, 1999).

Uma das desvantagens dos métodos espectroscópicos em chama é a necessidade de que a amostra seja introduzida na fonte de excitação em forma de uma solução, mais comumente uma solução aquosa. Para se obter a solução do analito, é geralmente necessário um tratamento preliminar da amostra que, geralmente, consome tempo e introduz mais erros do que aqueles próprios da medida espectroscópica. Além, disso os reagentes usados na decomposição de uma amostra podem introduzir interferências espectrais e não espectrais (SKOOG, et al., 1998).

### **2.2.2 Atomização em forno de grafite**

Para a determinação de elementos traço, a técnica GF AAS é bastante apropriada e tem sido amplamente usada devido à sua seletividade, sensibilidade e capacidade de analisar, com mínima ou nenhuma preparação, amostras com matrizes diversas como sedimentos, tecidos biológicos, fluidos corpóreos, água, alimentos, combustíveis, e outros (SKOOG et al., 1998).

Uma vez dentro do tubo de grafite, a amostra é submetida a um programa de temperatura, incluindo três passos básicos: secagem da amostra, decomposição térmica da matriz (pirólise) e produção de átomos livres no estado vapor (atomização), e dois passos complementares: limpeza do forno e resfriamento. Na etapa de secagem, ocorre a evaporação do solvente da amostra, seguida da destruição da matriz na etapa de pirólise, com conseqüente eliminação dos concomitantes da amostra. A atomização é a etapa na qual ocorre a formação da nuvem atômica do analito e a leitura do sinal de absorvância (SKOOG et al., 1998).

A técnica GF AAS possui alguns diferenciais em relação a F AAS, o principal é que o forno de grafite permite que a eliminação da matriz, cuja presença pode diminuir o desempenho analítico, e a atomização da amostra ocorram em momentos distintos, através do programa de temperatura do forno (WELZ & SPERLING, 1999). Outra vantagem é que o forno de grafite confina o vapor atômico no caminho ótico por um tempo maior e em volume menor do que na chama, fornecendo uma maior sensibilidade (HARRIS, 2001). As quantidades de amostra também são diferentes, pois enquanto F AAS requer pelo menos 1 a 2 mL para realizar a análise, para GF AAS a quantidade adequada pode ser de até 1  $\mu$ L (HARRIS, 2001).

As características requeridas pelos espectrômetros de absorção atômica com forno de grafite são completamente diferentes das requeridas pelos espectrômetros com chama. O conjunto de características instrumentais desejáveis para GF AAS é descrito pelo conceito STPF (do inglês, *Stabilized Temperature Platform Furnace*), conceito introduzido por Slavin na década de 80. Este conceito tem como principais pontos a atomização da amostra a partir de uma plataforma de L'vov, medida da absorvância integrada ao invés da altura do pico, o uso de modificadores químicos e um eficiente sistema de correção de fundo. Mais tarde, o uso de tubos com aquecimento transversal substituindo os atomizadores longitudinais, foi acrescentado ao conceito, resultando, assim, em condições de atomização essencialmente isotérmicas (SLAVIN et al., 1989).

O uso de plataforma é uma das condições usadas para garantir determinações livres de interferência no forno de grafite. A plataforma atrasa a atomização do analito permitindo que as paredes do tubo e a atmosfera gasosa alcancem o equilíbrio térmico. Atualmente, existem dois tipos de plataformas comercialmente disponíveis, a plataforma de L'vov e o tubo com plataforma integrada. Segundo Lajunen, o aquecimento excepcionalmente rápido da plataforma de menor massa, como é o caso da integrada, leva à maior eficiência de atomização e a temperaturas de atomização mais baixas, proporcionando maior tempo de vida para o tubo de grafite e menor tempo de análise (LAJUNEN, 1992).

Junto com o estabelecimento do conceito SPTF, surgiram acessórios e modificações que tornaram a GF AAS uma técnica extremamente atraente e competitiva. Essas modificações referem-se à automação do processo de introdução da amostra no forno de grafite; controle da instrumentação com recursos eletrônicos modernos, possibilitando um aquecimento ultra-rápido (1500 °C/s); correção de fundo com o corretor Zeeman; melhoramento dos tubos de grafite, permitindo uma maior vida útil dos mesmos e sensibilidade das medidas. Todos estes desenvolvimentos resultaram em uma redução significativa nas interferências (WELZ & SPERLING, 1999).

#### 2.2.2.1 Modificadores químicos

O emprego de modificadores químicos é uma prática comum em determinações por GF AAS, principalmente para elementos voláteis, e têm como objetivo criar um ambiente químico favorável à detecção dos analitos pela melhor separação destes da matriz, durante a etapa de pirólise (WELZ & SPERLING, 1999).

O modificador é uma substância adicionada no tubo de grafite, previamente, juntamente ou posteriormente à introdução da amostra, cuja principal função é diminuir, ou até mesmo eliminar, interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra, por meio do aumento da eficiência da etapa de pirólise. O modificador atua diminuindo a estabilidade térmica dos concomitantes ou convertendo analitos voláteis em espécies mais estáveis termicamente, permitindo o uso temperaturas de pirólise mais altas. Com uma temperatura de

pirólise elevada, é viável a eliminação dos concomitantes, sem com isso afetar a atomização do analito de interesse (WELZ & SPERLING, 1999).

A escolha de um modificador deve considerar aquele que permita um aumento significativo na temperatura de pirólise, mas que não eleve consideravelmente o sinal do branco, nem gere sinais de fundo de difícil correção. Além disso, como os modificadores são usados em concentrações relativamente elevadas, não devem conter elementos que são freqüentemente determinados no mesmo laboratório, para evitar possíveis contaminações (WELZ et al., 1992).

O modificador químico pode atuar de duas formas: combinando-se com o analito, aumentando sua estabilidade térmica ou combinando-se com a matriz aumentando sua volatilidade. Os elementos utilizados como modificadores químicos são geralmente metais e devem apresentar as seguintes características (WELZ & SPERLING, 1999):

- Permitir a estabilização do analito até uma temperatura de pirólise relativamente alta (aproximadamente 1000 °C), eliminando total ou parcialmente os concomitantes;
- O mesmo tipo de modificador deve ser aplicável a um grande número de analitos, contribuindo para maior simplicidade no processo de determinações;
- O modificador deve ser encontrado em uma forma altamente pura, e não deve conter concentrações mensuráveis do analito de interesse;
- Em muitos casos é desejável que a espécie seja refratária e/ou forme compostos refratários;
- Preferencialmente, o modificador não deve reduzir a vida útil do forno de grafite;
- O modificador não deve produzir uma excessiva atenuação de fundo, em comprimentos de onda próximos do elemento de interesse.

Existem dois tipos de modificação química: a modificação química convencional, onde o modificador está presente em solução e é adicionado antes, depois ou conjuntamente com a amostra e a modificação química permanente, na qual o modificador é impregnado previamente na superfície da plataforma ou na parede do forno de grafite (WELZ & SPERLING, 1999).

Inúmeros elementos já foram utilizados como modificadores químicos convencionais, mas é a mistura nitrato de paládio e nitrato de magnésio a mais

utilizada e reconhecida como modificador universal. Como modificadores químicos permanentes são utilizados os elementos do grupo da platina (Pt, Ir, Ru, Rh) e os elementos formadores de carbetos (Zr, W, Nb, Ta), e também misturas destes (WELZ & SPERLING, 1999).

### **2.3.3 Interferências em AAS**

Interferência é qualquer efeito que modifica o sinal enquanto a concentração do constituinte permanece inalterada. Em todo processo analítico sempre haverá a possibilidade de ocorrer algum tipo de interferência. O sinal da espécie de interesse é geralmente afetado por alguns componentes que acompanham o analito durante a determinação analítica (LAJUNEN, 1992).

Dois tipos de interferências podem ser encontrados em espectrometria de absorção atômica. A interferência espectral que se refere à sobreposição do sinal do constituinte com os sinais relativos a outros elementos ou moléculas na amostra ou com sinais relativos à chama ou ao forno e a interferência química que é causada por qualquer componente da amostra que diminui o grau de atomização do constituinte (SKOOG, 1998).

#### **2.3.3.1 Interferências em F AAS**

As interferências espectrais são causadas pelo isolamento incompleto da radiação da linha analítica, ou seja, por radiação estranha que está alcançando o detector, ou absorção da linha analítica por átomos, moléculas ou partículas que não sejam o analito. No entanto, estas interferências da chama podem ser subtraídas utilizando-se os chamados corretores de fundo.

As interferências não espectrais alteram o percentual de átomos livres do analito no volume de absorção, e podem ser subdivididas em interferência de transporte, interferência na fase condensada e interferência na fase vapor.

*a) A interferência de transporte* relaciona-se a alguma alteração das propriedades físicas da solução amostra em relação à solução de referência, como viscosidade, tensão superficial, pressão de vapor e temperatura, o que irá resultar

em algum efeito na taxa de aspiração e nebulização das soluções, evaporação do solvente, vaporização do analito e espalhamento da luz. Este tipo de interferência pode ser minimizado, quando se procura igualar a composição química das soluções amostra e de referência. Porém, se a composição da amostra não é conhecida, e interferências de concomitantes são esperadas. O efeito de matriz, em uma determinada análise, pode ser observado por vários métodos. Entre estes, estão o teste da recuperação do analito, o teste da diluição, a análise de um material certificado e a comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas nos diferentes meios.

*b) A interferência na fase condensada* ocorre devido a processos que resultam em atomização incompleta do analito. Este tipo de interferência ocorre quando o analito forma, com outra espécie reativa, um novo composto termicamente mais estável, causando uma diminuição na atomização do analito. Exemplos típicos são os metais alcalinos terrosos, quando determinados na presença de fosfatos, aluminatos ou silicatos. Esta interferência pode ser minimizada usando um reagente liberador, o qual se liga ao interferente, deixando o analito livre; ou pelo uso de um agente protetor, que irá se combinar com o analito para formar um composto mais volátil e menos refratário do que com o interferente.

*c) A interferência na fase vapor* pode acontecer quando átomos vaporizados do analito, já na fase gasosa, reagem com outros átomos ou radicais presentes. A ionização é um exemplo de interferência que ocorre na fase vapor. A ionização parcial de um elemento ocorrerá mais intensamente em chamas quentes e com elementos que possuem baixo potencial de ionização, o que irá afetar significativamente a sensibilidade e a linearidade de uma curva de calibração. Este tipo de interferência é comum para os metais alcalinos e alguns metais alcalinos terrosos, quando são determinados em uma chama de óxido nitroso-acetileno. Este efeito pode ser minimizado utilizando uma chama mais fria, como ar-acetileno, ou um supressor de ionização (LAJUNEN, 1992; WELZ & SPERLING, 1999).

#### 2.3.3.2 Interferências em GF AAS

Apesar de existir uma etapa específica para a eliminação da matriz, desde sua introdução a técnica de GF AAS tem mostrado uma susceptibilidade a interferências de matriz, as quais podem causar severas reduções ou aumentos no sinal analítico. Aqui também as interferências podem ser classificadas em espectrais e não espectrais.

As interferências espectrais podem ser de dois tipos: interferências de emissão e de absorção de fundo. As interferências de emissão são causadas pela radiação emitida pelo tubo ou plataforma de grafite que atinge o detector. Estas levam a um aumento no ruído e ainda podem “cegar” a fotomultiplicadora provocando medidas incorretas. A absorção de fundo é a atenuação da radiação no comprimento de onda do analito pela absorção molecular e/ou pelo espalhamento da radiação por componentes da amostra não dissociados (efeito de matriz). Tais interferências podem ser atenuadas através do tratamento da amostra, do uso de corretor de fundo adequado ou do uso de modificador químico.

As interferências não espectrais podem ser divididas em físicas e químicas. As físicas tendem a alterar o perfil do pico de absorção por mudanças no tempo de aparecimento do sinal de absorção atômica e, dessa forma, a temperatura aparente do analito. Isso resulta numa mudança no perfil do sinal e, por conseguinte, na resposta do analito. Exemplos de mecanismos sugeridos para interferências físicas incluem co-volatilização do analito com a matriz volátil e oclusão do analito nos cristais da matriz. Interferências químicas podem ser causadas pela reação entre a espécie de interesse e as paredes quentes do forno de grafite formando carbetos refratários e pela formação de moléculas gasosas estáveis que são perdidas antes de serem decompostas em átomos. Para evitar este tipo de interferência é feito o tratamento químico da superfície do forno de grafite (WELZ & SPERLING, 1999).

### **2.3 Uso de emulsões na determinação de metais por espectrometria de absorção atômica**

Embora o desenvolvimento da instrumentação tenha possibilitado avanços em muitos aspectos da Química Analítica, em muitos casos a instrumentação não permite analisar quimicamente amostras em sua forma original, pois elas podem conter espécies interferentes ou serem incompatíveis com o equipamento analítico.



Para contornar tais problemas, são empregados procedimentos de preparo da amostra, os quais podem incluir várias etapas. A preparação da amostra para análise pode ser considerado ainda o "calcanhar de Aquiles" de todo o procedimento analítico, devido ao fato dessas etapas serem lentas e apresentarem a possibilidade de contaminação e/ou perda das espécies de interesse durante o manuseio da amostra (CARASEK, 2002).

Os tensoativos possuem a capacidade de modificar algumas propriedades visando melhora na sensibilidade e/ou seletividade do método analítico, sendo que as principais características do seu uso estão relacionadas à formação de ambientes organizados, também conhecidos como ambientes micelares (MANIASSO, 2001). Agentes com atividades de superfícies tem a capacidade de modificar propriedades químicas (reacionais) e físicas (tensão superficial, densidade, viscosidade, pressão osmótica, etc.) do sistema em que se encontram (SANZ-MEDEL et al., 1999).

Os ambientes micelares proporcionados por tensoativos como micelas, microemulsões, emulsões e vesículas tem sido extensivamente empregados em Química Analítica. Pode-se destacar seu uso em vários processos de separação como, por exemplo, na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), extração, filtração com gel, ultra-centrifugação e eletroforese capilar (KHALEDI, 1997; SKOOG et al., 1998).

Em AAS o emprego de meios organizados por tensoativos tem se destacado com base principalmente nos seguintes benefícios nos aspectos físicos: (a) aumento da eficiência de nebulização; (b) aumento da dissolubilidade de substâncias em diferentes solventes; (c) aumento da compatibilidade entre fases aquosas e orgânicas; (d) aumento da homogeneidade da solução pela emulsificação; (e) melhora das propriedades óticas das soluções e (f) diminuição do ângulo de contato das soluções sobre superfícies sólidas como o forno de grafite, melhorando o espalhamento da gota da amostra. Os benefícios em termos de propriedades químicas podem ser citados: (a) aumento da eficiência na formação de espécies voláteis em técnicas de geração de hidretos; (b) modificação da posição de equilíbrio de uma reação com favorecimento da espécie química desejada e (c) catálise de reações (SANZ MEDEL et al., 1999).

A separação em duas fases isotrópicas, geradas a partir de sistemas micelares, é utilizada para extrair diversos tipos de analitos por meio do processo

denominado extração no ponto nuvem (EPN). Neste processo, os tensoativos não iônicos e anfóteros acima da concentração micelar crítica e aquecidos a uma determinada temperatura, podem separar-se em duas fases distintas uma aquosa e a outra rica em tensoativo contendo o analito extraído (BEZERRA & FERREIRA, 2006). A EPN tem sido amplamente aplicada para a extração e/ou a pré-concentração de espécies inorgânicas para posterior análise por AAS nas mais variadas amostras como água, alimentos, amostras biológicas e amostras ambientais (SAITOH et al., 1995; NASCENTES & ARRUDA, 2003; SUSSULINI et al., 2006; MARANHÃO et al., 2007; SANG et al., 2007).

Os tensoativos também têm sido aplicados como coadjuvantes na preparação de suspensões de amostras (técnica conhecida como “*slurry-sampling*”). Estes agentes, quando adicionados às suspensões, agem como estabilizantes e ajudam a manter sua homogeneidade. Eles podem atuar diminuindo a tensão entre as partículas sólidas, que muitas vezes têm características hidrofóbicas, e o meio; ou alterando as propriedades físicas da suspensão, como por exemplo, a viscosidade (MAGALHÃES & ARRUDA, 1998). Alimentos variados, como chocolate em pó, leite e comidas de bebê já foram analisados com esta técnica (GARCÍA et al., 1999; VIÑAS et al., 2000; BARALKIEWICZ et al., 2004; SANTOS et al., 2005; SILVA, et al., 2006).

Emulsões e microemulsões têm sido utilizadas como métodos de preparo de amostra para posterior determinação por espectrometria. Em AAS destaca-se o seu uso em produtos derivados do petróleo como betume, óleo cru, óleos lubrificantes, petróleo condensado, diesel, gasolina, querosene, biodiesel e asfalto (PLATTEAU & CARRILLO, 1995; AUCELIO et al., 2000; AUCELIO & CURTIUS, 2002; BURGUERA et al., 2003; AUCELIO et al., 2004; BURGUERA et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2007; DE JESUS et al., 2008; SANTELLI et al., 2008). Em análises por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP, do inglês *Inductively Coupled Plasma*), os óleos vegetais são as amostras mais freqüentes (CASTILLO et al., 1999; MURILLO et al., 1999; JIMENEZ et al., 2003; ANTHEMIDIS et al., 2005; DE SOUZA et al., 2005). Embora tensoativos catiônicos, como brometo de cetil trimetilamonio (CTAB), e aniônicos, como dodecil sulfato de sódio (SDS), tenham seu uso relatado no preparo destas emulsões, os tensoativos não iônicos são os mais utilizados para fins analíticos, e o Triton X100 é o mais frequente. Os procedimentos para preparo

destas emulsões e micro emulsões são os mais variados possíveis, sendo citada até mesmo a formação *on line* de emulsões através de sistemas em fluxo (JIMENEZ et al., 2003; ANTHEMIDIS et al., 2005; BURGUERA et al., 2005).

### 3 OBJETIVOS

---

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o uso de sistemas emulsionados para análise de amostras com alto teor lipídico através de espectrometria de absorção atômica.

Os objetivos específicos foram:

1. Investigar o uso de emulsões como procedimento de preparo da amostra para uma determinação rotineira de Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe em amostras de ovos de galinha, chocolates, óleos vegetais, margarinas e manteigas por espectrometria de absorção atômica com chama.
2. Desenvolver e validar metodologia de análise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para determinação de selênio em amostras de ovos usando um sistema emulsionado contendo surfactante, amostra de ovo, óleo e água para o preparo da amostra.
3. Desenvolver e validar metodologia de análise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para determinação de Cr, Mn, Pb, Ni, Cd, As e Cu em amostras de óleos vegetais, margarina e manteiga usando um sistema emulsionado contendo apenas a amostra oleosa, surfactante e água para o preparo da amostra.
4. Desenvolver e validar metodologia de análise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para determinação de Al, Cu e Mn em amostras chocolates usando microemulsões contendo apenas a amostra, surfactante e água para o preparo da amostra.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 Instrumentação

A instrumentação analítica utilizada no desenvolvimento deste trabalho está descrita a seguir:

- Espectrômetro de absorção atômica ANALYTIK Jena AG (Jena, Alemanha) modelo novAA 300.
- Espectrômetro de absorção atômica modelo ZEE nit 600 equipado com: atomizador de grafite transversalmente aquecido (Analytik Jena, Jena, Germany); auto-amostrador modelo MPE 60z; corretor de fundo com efeito Zeeman.
- Lâmpadas de cátodo oco SpectrAA (Varian, Austrália) como fonte de radiação.
- Capela de Fluxo Laminar classe 100 (Trox, Curitiba, Brazil).
- Destilador de ácidos a Bergrof BSB 939-IR (Enigen, Germany).
- Agitador mecânico Edmund Bühler 7400.
- Medidor de pH Digimed D 20 (São Paulo, Brasil).
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore.
- Balança analítica Sartorius com precisão 0,1 mg.
- Agitador vórtex.
- Viscosímetro de vidro Cannon-Fenske.

## 4.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram produtos de grau de pureza analítico, e todas as emulsões foram preparadas com água destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q (resistividade elétrica de 18.2 MΩ cm).

Ácido nítrico concentrado utilizado neste estudo foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os surfactantes não-iônicos usados no preparo dos sistemas emulsionados foram: Monooleato de sorbitan etoxilado (Tween 80) (Fluka, UK); 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil polietilenoglicol (n=9 ou 10) (Triton X-100) (Fluka, Suíça); e o (1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil polietilenoglicol (n=7 ou 8) (Triton 114) (Sigma-Aldrich, E.U.A.).

Óleo de milho comercial, oleato de decila (DEG, Brazil) e estearato de octila (Galena, Brazil) foram utilizados como fase oleosa.

Os materiais de referência certificado (MRC) Whole Egg Powder (RM 8415) e Baking Chocolate (RM 2384) foram fornecidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST, E.U.A.).

Seleno-metionina foi usada nos ensaios de recuperação (Acrós Organics, E.U.A.).

Todas as soluções padrões de metais ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) foram obtidas do National Institute of Standards and Technology (NIST, EUA) e diluídas conforme necessário para obter soluções de concentrações intermediárias.

Modificadores químicos usados na determinação de alguns metais por GF AAS foram: nitrato de paládio ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) (Fluka), nitrato de magnésio ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) (Sigma Aldrich) e nitrato de níquel ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) (NIST).

Argônio 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi empregado como gás de arraste nas determinações por GF AAS.

Para as medidas por FAAS foram utilizados os gases ar, acetileno e óxido nítrico todos fornecidos pela White Martins (São Paulo, Brasil).

### 4.3 Amostras

Para a determinação de Se em ovos foram utilizadas amostras provenientes de aves tratadas com rações enriquecidas com Se. Cinqüenta aves fêmeas reprodutoras Cobb 500 com 22 semanas de idade foram pesadas e selecionadas antes do alojamento. Cada ave foi colocada individualmente em uma gaiola de arame com dimensões de 33x46x40 cm. As galinhas foram alimentadas com dieta basal contendo suplementação de Se durante 25 semanas e, então, foram determinados cinco tratamentos (n=10) compostos ou de selenito de sódio (inorgânico) ou de Zn-L-Se-metionina (orgânico) ou de uma mistura dos dois. As dietas foram como segue: T1 = 0,15% inorgânico; T2 = 0,30% inorgânico; T3 = 0,15% orgânico; T4 = 0,30% orgânico; T5 = 0,15% inorgânico e 0,15% orgânico. As amostras de ovos foram conservadas congeladas (-18°C) até a análise.

Para as determinações de Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe foram comprados ovos frescos de galinhas domésticas (*Gallus gallus*) ou em estabelecimentos comerciais, incluindo supermercados na cidade de Santa Maria, ou diretamente de pequenos produtores rurais. Um total de 6 amostras diferentes foi analisado, consistindo de um pool de amostras da mesma caixa que continha seis ovos cada.

As amostras de chocolates analisadas neste estudo foram compradas em supermercados de Santa Maria (Brasil) e o percentual de cacau foi variado. As amostras de chocolates foram cinco chocolates brancos (marcas: Neugebauer, Classic Nestlé, Lacta Laka, Neugebauer Dupy, Garoto), cinco chocolates ao leite (Neugebauer, Nestlé Classic, Lacta, Dupy de Neugebauer, Garoto) e sete chocolates preto (Neugebauer, Nestlé Classic, Lacta Amaro, Dupy da Neugebauer, Garoto, Neugebauer 70% cacau e Dark & Soft 50% cacau da Lacta).

Óleo de arroz, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de soja, azeite de oliva, margarina light, margarina e manteiga comercialmente disponíveis foram comprados em estabelecimentos comerciais. Com exceção do azeite de oliva que foram produtos da Espanha e Itália todas as amostras foram produzidas no Brasil.

#### **4.4 Controle da contaminação**

Os recipientes utilizados, tanto de vidro quanto de plástico, foram deixados em contato com uma solução de  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) em etanol por 48 horas, e lavados posteriormente com água purificada antes de serem utilizados.

Anteriormente ao procedimento de descontaminação com  $\text{HNO}_3$ , os recipientes de vidro foram deixados em contato com solução detergente de Extran 2% (v/v), por, no mínimo, 24 horas, e lavados com água ultra-pura em abundância, para garantir uma superfície livre de contaminação orgânica.

A contaminação do ar foi evitada utilizando-se uma câmara de fluxo laminar classe 100 para o preparo das soluções e amostras.



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

### **5.1 Sistemas emulsionados**

#### **5.1.1 Procedimento geral de preparo dos sistemas emulsionados**

Todas as emulsões deste trabalho foram preparadas usando uma seqüência específica garantir sua estabilidade. E um procedimento geral de preparo das emulsões pode ser determinado: pesar as alíquotas de surfactante, amostra oleosa ou componente oleoso, quando for o caso, e colocar em béqueres de 80 mL. Adicionar água aquecida sob agitação contínua para que ocorra o emulsionamento da amostra, após seguir adicionando água até que o volume exigido seja alcançado. Após agitação magnética deve ser mantida durante o arrefecimento por 15 minutos.

A temperatura da água adicionada deve observar o tensoativo usado e o tipo de amostra. As melhores temperaturas observadas foram: 65 °C para Triton X 100 e 75 °C para Tween 80 e Triton 114.

Existe uma relação entre a temperatura e a duração de agitação devido ao elevado movimento cinético das moléculas do emulsionante na interface óleo/água, por isso é necessário manter uma agitação contínua durante o processo de resfriamento, para evitar a demulsificação.

#### **5.1.2 Preparo das emulsões para determinações por AAS**

As amostras foram preparadas conforme explicado no item 5.1.1 e para todos os sistemas para alcançar o volume final (50 mL) foi utilizada água destilada em quantidade suficiente. A Figura 1 apresenta um fluxograma descrevendo a composição das emulsões de amostras para as determinações por FAAS e a Figura 2 descreve o preparo dos sistemas emulsionados usados nas determinações por GF AAS.

FIGURA 1 - Fluxograma sobre a descrição do preparo das amostras emulsionadas para posterior medida por FAAS.

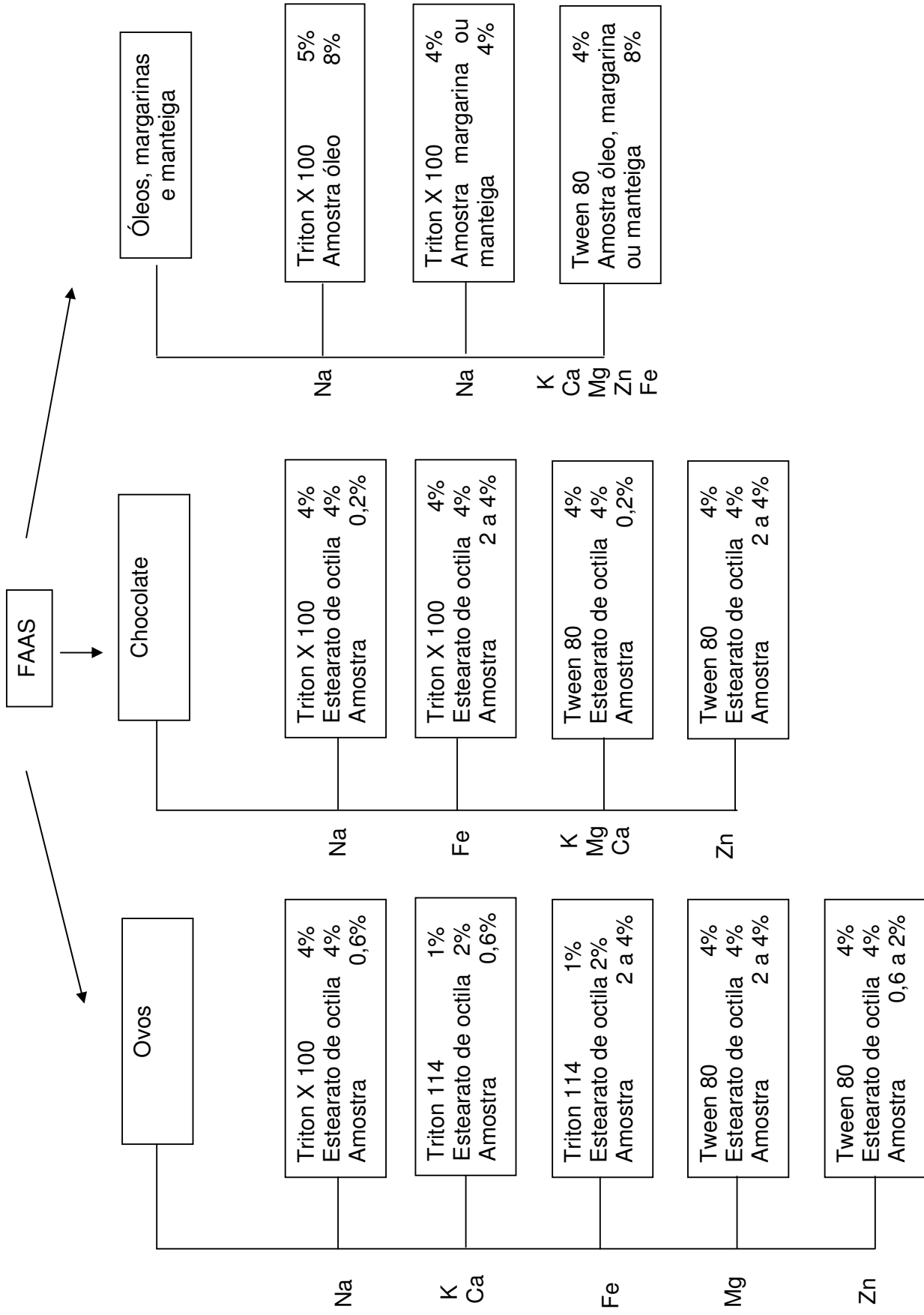
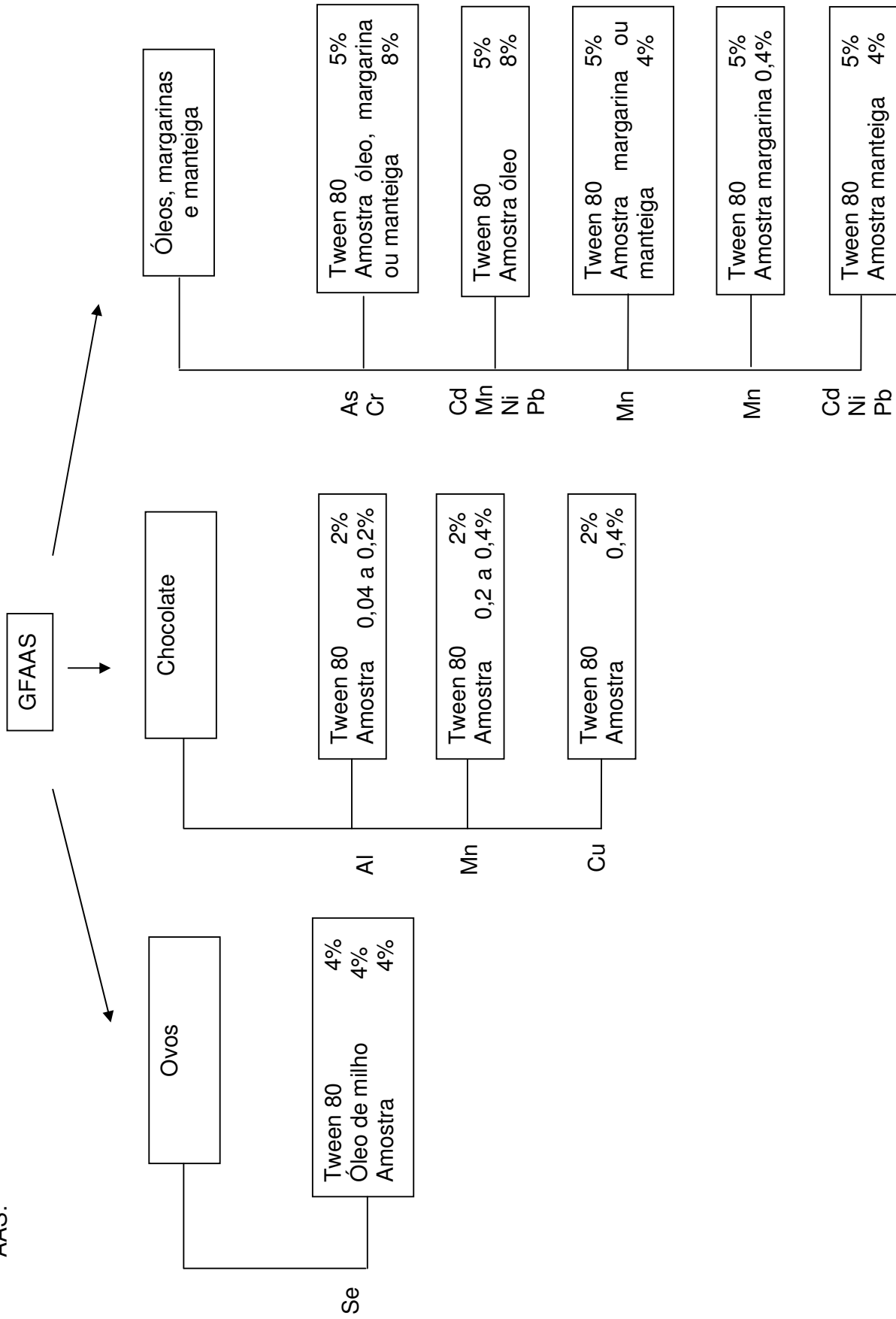


FIGURA 2 - Fluxograma sobre a descrição do preparo das emulsões e microemulsões das amostras para posterior medida por GF AAS.



### 5.1.3 Planejamento experimental

Para investigar a influência da quantidade de óleo e tensoativo sobre a estabilidade de emulsão, preliminarmente, foi aplicado um planejamento fatorial. A influência deles na estabilidade de emulsão foi avaliada usando um planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1). O design requereu um total de 9 experimentos por combinação óleo/emulsionante.

TABELA 1 – Variáveis e níveis do planejamento fatorial  $2^3$  para preparação das emulsões

Fator	Nível		
	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
Emulsionante (% p/v)	1,0	2,0	4,0
Óleo (% p/v)	1,0	2,0	4,0

### 5.1.4 Determinação da estabilidade

A estabilidade física das emulsões foi monitorada medindo a extensão da separação de fases. As melhores formulações do planejamento experimental, mostradas na Tabela 2, foram monitoradas por este teste. Para a medida da estabilidade, foram vertidos 10 mL de cada emulsão em tubos graduados e mantidos a temperatura ambiente (25 °C). O volume da camada separada (nata) em cada tubo foi registrado depois de 1, 2, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. O índice de estabilidade de emulsão (IEE) foi calculado como porcentagem:  $IEE (\%) = (\text{altura emulsão que permaneceu estável} / \text{altura inicial da emulsão}) \times 100$ . O IEE foi calculado para mostrar a estabilidade das emulsões desde que quanto maior o valor de IEE maior a estabilidade da emulsão.

### 5.5.5 Viscosidade

A viscosidade das emulsões foi medida a temperatura constante (25 °C) usando um viscosímetro de vidro Cannon-Fenske (Remington, 1998).

### 5.1.6 Resultados e discussão

O grande desafio quando se trata da aplicação de emulsões em análises químicas é que sua estabilidade que deve ser adequada o suficiente para permitir a análise. A baixa estabilidade das emulsões é relato freqüente em grande parte dos trabalhos já publicados.

O modo de preparo é um dos maiores responsáveis por se conseguir uma boa estabilidade. Sabe-se que é muito raro obter uma emulsão de maneira espontânea, ao contrário disso, deve ser aplicado energia ao sistema na forma de calor e agitação. Além disso, reagentes como ácido nítrico, que é comumente usado para a destruição da matriz orgânica no preparo de amostras para análises de metais, pode agir sobre a estrutura micelar formada pelos tensoativos, desestruturando-as.

Analisando trabalhos publicados que aplicam sistemas emulsionados para o preparo de amostras para determinações espectrométricas percebe-se que a maioria faz uso de ácido nítrico na decomposição da amostras e a aplicação de calor ao sistema é rara. Estes fatos, aliados a, por exemplo, a escolha inadequada do tensoativo pode levar a sistemas com baixa estabilidade.

O desenvolvimento de sistemas emulsionados viáveis, com baixa viscosidade, com estabilidade adequada e que permitissem a análise de metais por AAS em alimentos que contivessem uma composição centesimal lipídica relativamente alta constitui-se no principal objetivo geral do presente trabalho tendo em vista o desafio que é a análise deste tipo de amostra.

Em todas as aplicações foram usados alguns critérios essenciais para escolher a composição da emulsão e a quantidade relativa de cada componente nas emulsões:

✓ A emulsão de escolha seria O/A que é a mais adequada para fins analíticos, por comportar-se conforme a fase externa aquosa permite a calibração frente a padrões aquosos, além deste tipo de emulsão apresentar geralmente longa estabilidade e baixa viscosidade.

✓ A emulsão deveria conter somente os componentes necessários para produzir uma emulsão estável, em outras palavras, amostra, surfactante, água e um componente oleoso, se fosse o caso para melhorar a estabilidade.

✓ A emulsão deveria ser estável por um período razoável e não deveria produzir coalescência. No caso dela produzir floculação, cremagem ou sedimentos, a homogeneidade deveria ser alcançada com a simples agitação da mistura.

✓ A emulsão deveria ter baixa viscosidade para evitar, principalmente, o entupimento do capilar amostrador tanto do GF AAS como do FAAS

✓ Todos os componentes deveriam apresentar baixa absorção de fundo durante a medida por AAS e uma baixa contaminação pelo metal analisado.

✓ O surfactante deveria apresentar algumas características importantes para o seu emprego como, por exemplo, não possuir propriedades espumógenas, possuir baixa contaminação pelo metal analisado e ser solúvel na fase contínua, ou seja, hidrossolúvel.

#### 5.1.6.1 Estudos de formulação

O tipo de emulsão (óleo-água (O/A) ou água-óleo (A/O)), estabilidade e comportamento reológico são conhecidos por depender de três tipos de variáveis: da formulação físico-química, da composição e das condições fluido-mecânicas (REMINGTON, 1998). Assim, a quantidade de óleo, surfactante, água e a forma de agitação foram otimizadas para produzir emulsões estáveis e com baixa viscosidade.

Emulsão óleo-água (O/A) foi escolhida principalmente devido a suas características de estabilidade a longo prazo e por sua baixa viscosidade. Após escolher o tipo de emulsão apropriada, o próximo passo é selecionar o emulsionante. As características ideais do tensoativo para cada sistema óleo-água é determinado pelo equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), surfactantes com valores de EHL entre 9.6 e 16.7 são considerados hidrófilos (solúveis em água), e tendem a formar emulsões O/A (SINKO, 2008). Triton 114, Triton X 100 e Tween 80 têm valores de EHL de 12,4, 13,5 e 15,0 respectivamente. Emulsionantes não-iônicos como Tween 80, Triton X 100 e Triton 114 satisfazem todas as exigências requeridas para serem usados em determinações por AAS, além de serem baratos e prontamente

disponíveis na maioria dos laboratórios analíticos. Óleo de milho, oleato de decila e estearato de octila foram escolhidos devido ao baixo custo e a fácil obtenção.

A relação óleo/surfactante foi determinada através de planejamento experimental. Em todos os experimentos nas quais a quantidade de óleo era menor que a quantidade de emulsionante, a separação de fases ocorreu imediatamente depois da preparação. Isto mostra que um excesso de emulsionante em relação à fase oleosa favorece a instabilidade da emulsão. As diversas combinações apresentaram comportamentos diferentes de estabilidade e as melhores formulações são mostradas na Tabela 2. A Tabela 2 também apresenta os metais possíveis de serem determinados em cada formulação, levando em consideração a baixa concentração dos mesmos como contaminantes nos óleos e tensoativos escolhidos na formulação..

TABELA 2 – Composição das formulações otimizadas e metais capazes de serem determinados em cada uma das formulações.

Formulação	Fase oleosa (%)	Emulsionante (%)		Metal	
1	Óleo de milho	4,0	Triton 114	2,0	K
2	Estearato de octila	4,0	Tween 80	4,0	K, Ca, Mg, Zn
3	Oleato de decila	2,0	Triton 114	1,0	K, Mg
4	Estearato de octila	2,0	Triton 114	1,0	K, Ca, Mg, Fe
5	Estearato de octila	4,0	Triton X 100	4,0	Na

A viscosidade da emulsão, a qual depende essencialmente do conteúdo da fase interna, pode ser usada para determinar sua adequabilidade para propósitos analíticos. Para relação O/A otimizada neste trabalho (8:92, O/A) a viscosidade manteve um valor quase constante ( $1,17 \pm 0,04$  cP a 25 °C, n=24). Como consequência, a injeção de amostra é facilitada e evitando problemas de reprodutibilidade pela aderência da fase oleosa nos capilares amostradores, principalmente do GF AAS.

Além da estabilidade das formulações e da possibilidade de determinação dos metais, era necessário determinar o nível de contaminação pelos metais estudados nos óleos e surfactantes investigados.

Para as determinações por GF AAS foi escolhido o tensoativo Tween 80 em todas as determinações por apresentar conteúdo abaixo dos limites de detecção para todos os metais escolhidos.

Para os metais determinados por FAAS, o conteúdo de metal do surfactante foi determinado após sua diluição em água, porém, no óleo esta medida foi realizada após a estabilização com um emulsionante que foi usado como branco. A Tabela 3 apresenta os conteúdos de metal nos óleos e surfactantes selecionados para este estudo. Triton 114 e Tween 80 apresentaram alto conteúdo de sódio e Triton X100 apresentou alto conteúdo de potássio e cálcio. Os componentes oleosos apresentaram baixa contaminação, com exceção do óleo de milho que apresentou conteúdo mais alto de cálcio. A contaminação limitou a escolha do surfactante e do óleo.

TABELA 3 - Níveis de concentração dos metais ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nos óleos e surfactantes usados neste estudo.

	Na	K	Ca	Mg	Zn	Fe
Óleo de milho	0,1	1,3	26,4	0,9	<LD	9,2
Estearato de octila	14,4	1,4	6,6	<LD	0,7	0,7
Oleato de decila	0,6	0,7	1,7	0,3	<LD	12,4
Triton 114	367	3,8	8,7	0,4	1,5	8,8
Tween 80	82	<LD	<LD	<LD	0,6	10,2
Triton X 100	1,3	342	32,1	<LD	0,2	3,5

#### 5.1.6.2 Formação e estabilização da emulsão

Como a formação espontânea de emulsão raramente acontece, este processo requer uma sucessão de passos: (i) formação de gotículas da fase interna



e (ii) estabilização destas gotículas na fase externa. Além disso, requer a aplicação de energia na forma de calor e agitação mecânica (ENGELS et al., 1995).

O aumento da temperatura reduz a tensão interfacial, porém o calor pode favorecer a separação das fases devido à energia cinética aumentada das gotículas. Normalmente, as emulsões são preparadas em temperaturas entre 70 a 80 °C, e a fase aquosa é aquecida 5 °C acima da fase oleosa. Porém, a temperatura máxima foi determinada pelo tipo de amostra como no caso das emulsões de ovos a temperatura usada foi 60 °C devido à presença de proteínas na matriz de ovo que poderiam coagular em temperaturas mais altas.

O comportamento de sistemas estáveis depende diretamente das condições de preparação, por isso foi tomado cuidado para assegurar que o procedimento fosse exatamente do mesmo modo para todos os experimentos (LACHMAN et al., 2001). O preparo da emulsão por inversão de fases, mudando a relação de água-óleo para óleo-água através do aumento do volume de fase externa de surfactante-água e correspondente decréscimo relativo do volume de fase interna, proporciona uma emulsão O/A finamente dispersa e com uma estabilidade a longo prazo (ENGELS et al., 1995). No período inicial de agitação, as gotículas necessárias para a emulsificação são formadas. Se a agitação exceder o período necessário para a estabilidade ideal, pode ocorrer adesão devido à colisão entre as gotículas. Este período de tempo é determinado, normalmente, empiricamente. Neste estudo, o tempo estipulado foi 2 minutos de agitação mecânico manual alcançar emulsificação, seguido de agitação magnético a 3000 RPM durante 15 minutos a temperatura ambiente para estabilização completa do sistema.

A estabilidade das emulsões pode ser determinada experimentalmente medindo-se a extensão da separação de fases (HUANG et al., 2001; MIRHOSSEINI et al., 2009). A aparência final de todas as emulsões foi branco leitoso e todas as emulsões de ovo apresentaram valores relativamente altos de IEE. A combinação estearato de octila/Tween 80/amostra de ovo apresentou valores mais altos de IEE ( $IEE_{1 \text{ dia}}=100 \%$  até  $IEE_{21 \text{ dias}}=97,5\%$ ). A combinação estearato de octila/Triton X100/amostra de ovo apresentou valores mais baixos IEE ( $IEE_{1 \text{ dia}}=97,6 \%$  até  $IEE_{21 \text{ dias}}=93,9\%$ ). Emulsões contendo material de referência certificada apresentaram um precipitado após 24 horas. O precipitado provavelmente foi formado pelo conteúdo

sólido que não foi estabilizado pelas micelas devido ao processo de liofilização, porém, a homogeneidade foi restabelecida pela agitação da mistura.

A estabilidade das emulsões foi verificada por inspeção visual durante 90 dias, a emulsão branco mostrou-se estável ao longo de todo período monitorado, porém as emulsões contendo amostra ou material de referência certificado apresentaram um precipitado após 24 horas. Todavia, coalescência não aconteceu. O precipitado foi provavelmente formado pelo conteúdo sólido que não foi estabilizado pelas micelas, porém a homogeneidade pode ser restabelecida pela agitação da mistura. A estabilidade alcançada foi considerada adequada para o propósito analítico deste trabalho.

#### 5.1.6.3 Emulsões das amostras

##### ***a) Emulsões de ovos:***

O ovo é uma amostra com alta viscosidade e alto conteúdo de matéria orgânica, e a sua análise direta tanto por GF AAS quanto por F AAS é particularmente difícil. Por ser um sistema naturalmente emulsionado, a fração lipídica da amostra teoricamente já estaria estabilizada. Entretanto, o uso de uma emulsão para a análise contribuiu com a redução a viscosidade e o conteúdo orgânico da amostra, mantendo a homogeneidade e estabilidade da amostra.

Na formulação da emulsão de ovo para análise de Se por GF AAS, o tensoativo escolhido foi o Tween 80. Este tensoativo possui valor de EHL capaz de produzir uma emulsão O/A, ele tem baixa absorção de fundo no GF AAS, não altera a viscosidade do meio e tem baixa contaminação. Para auxiliar na estabilidade da emulsão foi utilizado o óleo de milho foi utilizado como componente oleoso adicional. O óleo de milho foi escolhido por apresentar baixo fundo nas medidas por GF AAS e baixo conteúdo de Se. No preparo da emulsão teve que ser tomado o cuidado de não utilizar uma temperatura alta suficiente para provocar a desnaturação das proteínas do ovo. A emulsão resultante apresentou baixa viscosidade e uma estabilidade de mais de 90 dias sem produzir coalescência.

No desenvolvimento do método para determinar Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe em ovos de galinha por F AAS foram testados tensoativos e componentes oleosos diferentes daqueles usados no método por GF AAS devido a presença dos analitos como contaminantes.

Foram escolhidos os tensoativos não iônicos Triton 114, Triton X 100 e Tween 80 que são os mais freqüentemente aplicados em química analítica. Os componentes oleosos escolhidos foram o óleo de milho, oleato de decila e estearato de octila. Triton 114 e Tween 80 apresentaram alto conteúdo de sódio e Triton X100 apresentou alto conteúdo de potássio e cálcio. Os componentes oleosos apresentaram baixa contaminação, com exceção do óleo de milho que apresentou conteúdo mais alto de cálcio. A contaminação limitou a escolha do surfactante e do óleo. Porém, com posse destas informações pode-se saber quais metais poderiam ser determinados com cada combinação óleo/surfactante.

A aparência final de todas as emulsões foi branco leitoso e todas as emulsões de ovo apresentaram valores relativamente altos de IEE, desde que a composição das emulsões foram previamente aperfeiçoadas através de planejamento experimental. Emulsões contendo material de referência certificada apresentaram um precipitado após 24 horas. O precipitado provavelmente foi formado pelo conteúdo sólido que não foi estabilizado pelas micelas devido ao processo de liofilização, porém a homogeneidade foi restabelecida pela simples agitação da mistura.

Embora tenha um procedimento geral descrito para o preparo das emulsões, neste estudo foi necessário considerar que os metais estavam presentes em concentrações diferentes nas amostras de ovos e, então, devem ser usadas quantidades apropriadas de amostra para a concentração de cada elemento cair dentro da curva analítica. As quantidades de amostra variaram entre 0,6 e 4,0% (p/v) de acordo com a quantidade esperada do analito na amostra. Para componentes presentes em concentrações maiores, como sódio e potássio, a emulsão deveria ser preparada com uma quantidade de amostra de no máximo 0,6%. Para cálcio, quantidades entre 0,6 e 1,0% podem ser usadas e para magnésio, entre 0,6 e 2,0%. Finalmente, para zinco e ferro, quantidades entre 2,0 e 4,0% devem ser usadas.

## ***b) Emulsões de chocolate***

Chocolate também se apresenta como uma amostra complexa e com alto conteúdo de gorduras. A análise direta por FAAS não é possível e a determinação de metais neste tipo de matriz envolve, necessariamente, a digestão da amostra, considerando que ele contém um elevado teor de compostos orgânicos.

Com base nas informações já levantadas sobre a presença dos analitos nos tensoativos e óleos escolhidos, e das melhores combinações destes componentes o estudo da pré-formulação pode ser simplificado. Mesmo que amostras de ovos e de chocolate sejam relativamente diferentes, as emulsões mostraram sua versatilidade em termos de aplicabilidade, pois apresentaram estabilidade e viscosidades comparáveis as obtidas anteriormente.

Paras as emulsões de chocolate preparadas para as determinações por FAAS utilizou-se como tensoativo somente o triton X 100 e o tween 80. O triton X 100 que apresenta um menor conteúdo de sódio e, portanto é o ideal para medir este metal, porém apresenta elevado teor de potássio. O Tween 80, embora apresente um conteúdo de sódio relativamente alto, possui conteúdos baixos dos demais metais. E como fase oleosa somente o estearato de octila foi utilizado por ter apresentado baixas contaminações de todos os metais e uma facilidade na manipulação das emulsões.

As amostras de chocolate foram analisadas também por GF AAS, onde foram determinados Al, Cu e Mn. A alta sensibilidade do método faz com que baixas quantidades de amostra sejam requeridas e isto encorajou o uso de microemulsões.

O Tween 80 foi o tensoativo escolhido para este estudo. Experimentalmente foi observada com este emulsionante uma maior facilidade de manipulação da emulsão e uma maior flexibilidade em termos de variações na temperatura de emulsificação em relação aos outros emulsionantes utilizados. Considera-se assim o Tween 80 como um tensoativo de escolha para o preparo de emulsões para fins analíticos dada a sua versatilidade, devendo ser substituído por outro somente em casos específicos.

Desde que foi escolhido trabalhar com microemulsões não foi utilizado componente oleoso. No preparo da amostra foi utilizado somente o 2% do tensoativo e amostra de chocolate, cuja quantidade variou entre 0,04 e 0,4% dependendo do

metal. A solução resultante apresentou-se como um líquido límpido e transparente com a cor levemente amarronzada, aparência típica e característica de microemulsões.

A estabilidade das microemulsões foi estudada por inspeção visual por 60 dias e não apresentaram separação de fases. Todavia, apresentaram precipitados depois de 24 horas, provavelmente formado do conteúdo sólido que não foi estabilizado pelas micelas. A homogeneidade pode ser restabelecida agitando a mistura. Esta estabilidade foi considerada adequada para o propósito analítico deste trabalho.

### ***c) Emulsões de óleos vegetais, margarinas e manteigas***

Tendo em vista o caráter fundamentalmente oleoso e que quando corretamente estabilizada a amostra emulsionada é compatível com a maioria da instrumentação analítica, a emulsão deveria ser uma alternativa mais freqüente para o preparo deste tipo de amostras. Todavia o uso de emulsão no preparo destas amostras para análise espectrométrica é pouco relatado, e para análises por AAS não é muito empregado.

Emulsões já foram aplicadas para análise de metais em óleos e gorduras comestíveis por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP) (CASTILLO et al., 1999; MURILLO et al., 1999; JIMENEZ et al., 2003; ANTHEMIDIS et al., 2005; DE SOUZA et al., 2005). Com exceção dos estudos em que a formação da emulsão ocorre *on line* por sistemas de análise em fluxo e que a leitura ocorre imediatamente após a formação da emulsão (JIMENEZ et al., 2003; ANTHEMIDIS et al., 2005), a estabilidade da emulsão é geralmente um fator importante a ser considerado e deve pelo menos ser o suficiente para ocorrer a análise.

Com base nos resultados já apresentados foram escolhidos como tensoativos o Triton X100 para a determinação do sódio e Tween 80 para os demais metais. Devido aos metais estarem presentes em concentrações diferentes nas amostras de óleo, margarina e manteiga, quantidades de amostra apropriadas que permitissem a concentração do elemento para cair dentro da curva analítica tiveram que ser usadas. Quantidades de amostra variaram entre 0,4 e 8,0% (p/v) de acordo com a quantidade esperada do analito na amostra. Quatro tipos de emulsões, com variada

quantidade de amostra e tipo de emulsificante, foram necessárias para determinar todos os elementos por GF AAS e FAAS.

Como as amostras são a própria fase oleosa, a estabilidade da emulsão foi conseguida adicionando apenas água e surfactante. Além disso, como óleos vegetais, margarinas e manteiga são líquidas ou podem ser perfeitamente liquefeitas através de aquecimento, estas amostras são facilmente emulsionadas, favorecendo a estabilidade e homogeneidade do sistema.

As emulsões consistem de sistemas inerentemente instáveis (AULTON, 2005) e alcançar a estabilidade de um sistema formado por duas fases imiscíveis demanda certa habilidade e experiência do formulador. Neste trabalho este objetivo foi perfeitamente alcançado as emulsões finais de óleos vegetais, margarinas e manteiga apresentaram-se como um líquido branco leitoso com aspecto homogêneo, com baixa viscosidade, longa estabilidade e não ocorreu coalescência.

Diferentemente das emulsões, as microemulsões podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, opticamente transparentes, de baixa viscosidade e formando um sistema micro-heterogêneo, apesar de visualmente homogêneo. As microemulsões de margarina mostraram se aparentemente como uma “solução” límpida e homogênea sem apresentar gotículas de óleo suspensa o que demonstra que o óleo foi perfeitamente estabilizado pelas micelas do tensoativo.

Emulsões e micro-emulsões diferem na aparência. Neste estudo, as amostras de margarina preparadas a uma concentração de 0,4% se comportaram como micro-emulsões límpidas e transparentes. Todas as demais amostras preparadas com mais de 4,0% tinham aspecto branco leitoso conforme emulsões convencionais. A estabilidade das emulsões e micro emulsões de foram investigadas por inspeção visual durante 60 dias. As emulsões de amostra mostraram-se estáveis ao longo do período monitorado, não apresentando qualquer precipitado ou coalescência, sendo consideradas adequadas para o propósito analítico deste trabalho.

## **5.2 Determinações de metais por FAAS**

A qualidade dos produtos alimentícios recebe grande atenção devido à sua influência na nutrição e saúde humana. Neste contexto, a determinação de metais

traços se tornou um campo importante em análise de alimentos (REYES & CAMPOS, 2006; TUZEN & SOYLAK, 2007; DEMIREL et al., 2008). Porém, a determinação precisa destes metais em alimentos com alto teor lipídico ainda é um desafio analítico devido às dificuldades que surgem das características da matriz. A FAAS é uma técnica de detecção poderosa para determinar elementos traços. As vantagens do F AAS incluem sua simplicidade, poucas interferências e comparativamente baixo custo de instrumentação e manutenção (WELZ & SPERLING, 1999). Uma desvantagem, porém, é a frequente necessidade de pretratamento da amostra que é um passo necessário para determinar elementos traços em matrizes complexas.

### **5.2.1 Parâmetros instrumentais**

Todas as medidas foram realizadas usando um espectrômetro de absorção atômica ANALYTIK Jena AG (Jena, Alemanha) modelo novAA 300 equipado com lâmpadas de cátodo oco SpectrAA (Varian, Austrália) como fonte de radiação. A chama usada foi ar-acetileno ou acetileno-óxido nítrico; o fluxo de gás e a altura do queimador foram ajustados para obter o máximo de sinal de absorbância para cada elemento. Outros parâmetros instrumentais foram estabelecidos e os valores são mostrados na Tabela 4.

TABELA 4 - Parâmetros instrumentais para determinação dos metais

Metal	Comprimento de onda (nm)	Largura da fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Tempo de integração (s)	Chama
Na	589,0	0,8	3,0	3,0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> – ar
K	766,5	0,8	4,0	3,0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> – ar
Ca	422,7	1,2	4,0	3,0	N <sub>2</sub> O – C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Mg	285,2	1,2	2,0	3,0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> – ar
Zn	213,9	0,5	6,0	3,0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> – ar
Fe	248,3	0,2	8,0	3,0	N <sub>2</sub> O – C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>

### 5.2.2 Análise de amostras de ovos emulsionadas

O conhecimento da composição mineral dos ovos de galinha tem diferentes propósitos; incluindo a possibilidade de estimar do acúmulo de espécies tóxicas oriundas do ovo e de conhecer o real papel da sua composição ovo na nutrição humana (PAPPAS et al., 2006).

Os ovos estão incluídos em vários produtos alimentícios exercendo diversas funções, incluindo função emulsionante, onde agem formando um filme ao redor das gotículas de óleo estabilizando-as contra coalescência. Os ovos também proporcionam viscoelasticidade aos produtos, excelentes características sensoriais e texturais (KIOSSEOGLOU, 2003).

Devido à sua alta viscosidade e ao conteúdo orgânico da matriz, a análise direta de ovos por FAAS é particularmente difícil. Os métodos relatados na literatura para tratamento da amostra de ovo envolvendo digestão com ácidos e peróxidos (KILIÇ et al., 2002; PAPPAS et al., 2006; PAN et al., 2007), tentam melhorar a digestão combinando o uso destes reagentes com radiação ultravioleta (MANJUSHA et al., 2007) ou microondas (MINE et al., 1998; BARGELLINI et al., 2008; BURGER & GOCHFELD, 2003; ULUOZLU et al., 2009). Entretanto, todos estes procedimentos



resultam em passos adicionais que podem levar a inconvenientes como erros de amostragem, contaminação e perdas durante manipulação (MANJUSHA et al., 2007).

Emulsificação direta com surfactantes é um procedimento rápido para o preparo da amostra, pois não requer qualquer destruição da matriz orgânica (SANZ-MEDEL et al., 1999). Simplesmente reduz a viscosidade e o conteúdo orgânico da amostra, fazendo as propriedades da emulsão adequadas para serem analisadas por F AAS, mantendo a homogeneidade e estabilidade do sistema. As vantagens esperadas deste procedimento é a manipulação mais fácil da amostra, buscando-se também o uso de soluções aquosas para calibração.

#### 5.2.2.1 Desenvolvimento do método

As características de um método analítico são definidas pelas figuras de mérito que devem ser determinadas experimentalmente. O método proposto foi validado para os seis metais (Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe). As figuras de mérito apresentadas foram linearidade das curvas analíticas, precisão e exatidão. Além disso, a sensibilidade foi determinada através da concentração característica ( $c_0$ ).

As vantagens do procedimento de emulsificação para amostras gordurosas são descritas na literatura. Quando corretamente estabilizada, a amostra emulsificada é compatível com a maioria da instrumentação analítica, permitindo o uso de procedimentos de calibração simples devido a minimização de interferências (SANZ-MEDEL et al., 1999). Neste estudo, calibração com soluções de calibração aquosas foi possível e as faixas de linearidade foram selecionadas conforme as concentrações de metais esperadas nas reais amostras. Curvas analíticas foram construídas avaliando a relação entre resposta (altura do pico e absorbância) e concentração através de análise de regressão linear, os resultados são mostrados na Tabela 5. Em todos os casos, a linearidade foi adequada para o propósito. A Tabela 5 também apresenta os valores encontrados para concentração característica e limite de detecção (LD) para todos os elementos.

TABELA 5 - Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metais em amostras de ovo emulsionadas.

Metal	Faixa (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da regressão <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	c <sub>0</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Na	1,0 – 8,0	$A=(0,0032+0,2038 C)/(1+0,0728 C)$	0,9999	0,0263
K	1,0 – 10,0	$A=-0,003549+0,104891 C$	1,0000	0,0426
Ca	0,5 – 8,0	$A=0,001232+0,110905 C$	0,9996	0,0395
Mg	0,5 – 4,0	$A=(0,0147+0,4702 C)/(1+0,2392 C)$	0,9944	0,0139
Zn	0,05 – 0,4	$A=0,001455+0,13473 C$	0,9923	0,0357
Fe	0,1 – 2,0	$A=-0,001426+0,02232 C$	0,9979	0,2412

<sup>a</sup>Absorvância; C (mg L<sup>-1</sup>)=concentração do elemento na solução padrão

A exatidão do método foi posteriormente confirmada pela determinação dos metais no MRC Whole Egg Powder. Os resultados são mostrados na Tabela 6. A comparação estatística através do teste *t* mostrou que não houve nenhuma diferença significativa entre os valores obtidos com o método proposto e os valores certificados.

A precisão dos procedimentos foi determinada através da repetibilidade (precisão intra-dia). Foram analisadas seis emulsões de ovos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária (entre-dias) foi avaliada analisando emulsões preparadas em três dias diferentes (n=3). A repetibilidade apresentou bons valores de DPR para todos os metais. A precisão intermediária foi avaliada usando o DPR e teste *F*. Os valores de *F* calculados foram menores que os valores tabelados, não indicando diferença significativa entre os resultados obtidos em dias diferentes. Todos os dados de precisão são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6 - Precisão do método proposto para os metais selecionados e exatidão avaliada usando material de referência certificado (Egg whole powder, NIST RM 8415).

Metal	Formulação <sup>a</sup>	Concentrações $\mu\text{g g}^{-1}$		Recuperação		$t_{\text{exp}}^c$	Precisão	
		Valor certificado	Valor encontrado <sup>b</sup>	(%)			Intra dia (DPR)	Intre dias (DPR/ $F_{\text{exp}}^d$ )
Na	5	3770 $\pm$ 34	3854 $\pm$ 25	102,2		1,46	0,8	0,6/2,25
K	4	3190 $\pm$ 37	3241 $\pm$ 99	101,6		0,25	2,4	2,3/3,27
Ca	4	2480 $\pm$ 19	2419 $\pm$ 75	97,6		2,30	3,0	3,3/3,99
Mg	2	305 $\pm$ 27	297 $\pm$ 12	97,5		0,67	1,1	1,9/3,34
Zn	2	67.5 $\pm$ 8	68.6 $\pm$ 2.7	101,6		0,94	4,2	3,3/3,98
Fe	4	112 $\pm$ 16	110.9 $\pm$ 3.7	99,0		1,62	3,5	5,3/3,06

<sup>a</sup>A partir da Tabela 4.2.3

<sup>b</sup>Valor médio  $\pm$  desvio padrão

<sup>c</sup> $t_{\text{tab}} = 2,31$  ( $p$  0,05)

<sup>d</sup> $F_{\text{tab}} = 4,26$  ( $p$  0,05)

DPR= desvio padrão relativo

### 5.2.2.2 Aplicação em amostras reais

O método proposto foi aplicado na determinação de Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe em amostras de ovos. O objetivo foi avaliar as concentrações destes elementos em ovos de seis fornecedores diferentes (comercial e ovos de granja). Foram realizadas seis determinações para cada elemento e os resultados estão apresentados na Tabela 7. Não houve diferença significativa entre o conteúdo dos componentes majoritários (Na, K, Ca e Mg) nos ovos de diferentes origens. As variações maiores foram nos conteúdos dos componentes secundários, Zn e Fe, que variaram de 7,4 a 12,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  e de 24,5 a 44,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

Informações sobre a composição mineral dos ovos têm sido investigadas (SHANG & HONG, 1997; KILIÇ et al., 2002; BURGER & GOCHFELD, 2003; PAPPAS et al., 2006; MANJUSHA et al., 2007; PAN et al., 2007; BARGELLINI et al., 2008), porém apesar do interesse, os dados são ainda limitados. Os níveis de Ca, Mg, Zn e Fe obtidos neste estudo foi semelhante aos relatados por Shang e Hong (1997). Não há nenhum relato na literatura para os níveis de Na e K. O método proposto pode ser de interesse em pesquisas avícolas e de nutriologia, além de, pode ser recomendado para análises rotineiras. Também pode ser aplicado, certamente, para determinação de metais em ovos de outras espécies de aves.

TABELA 7 – Concentração dos metais ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{DP}$ , n=6) nas amostras de ovos

Amostras	Na	K	Ca	Mg	Zn	Fe
1	1410 $\pm$ 5	1186 $\pm$ 29	525 $\pm$ 15	154 $\pm$ 2	12,2 $\pm$ 0,8	37,4 $\pm$ 2,5
2	1492 $\pm$ 12	1259 $\pm$ 40	486 $\pm$ 16	133 $\pm$ 4	7,4 $\pm$ 0,5	24,5 $\pm$ 1,0
3	1477 $\pm$ 11	1167 $\pm$ 53	509 $\pm$ 8	137 $\pm$ 1	10,4 $\pm$ 0,7	36,6 $\pm$ 3,1
4	1444 $\pm$ 22	1222 $\pm$ 29	567 $\pm$ 23	149 $\pm$ 2	11,3 $\pm$ 0,4	44,2 $\pm$ 1,7
5	1618 $\pm$ 24	1205 $\pm$ 75	426 $\pm$ 7	161 $\pm$ 1	11,0 $\pm$ 0,7	35,3 $\pm$ 2,8
6	1596 $\pm$ 13	1157 $\pm$ 65	494 $\pm$ 14	143 $\pm$ 1	11,1 $\pm$ 0,5	38,5 $\pm$ 4,7

### 5.2.3 Análise de amostras de chocolates emulsionadas

Chocolate é um produto obtido a partir dos grãos de *Theobroma cacao*. A fim de processar os grãos em chocolate ou cacau, estes são deixados para fermentar, são secos, torrados e, finalmente, triturados até serem transformados em um licor. As classes primárias de chocolates são preto, ao leite e branco. O primeiro é feito pela mistura de licor de cacau, manteiga de cacau, açúcar e baunilha. O segundo usa o mesmo processo, com adição de leite e o chocolate branco não inclui licor de cacau, apenas manteiga de cacau, leite e açúcar (AFOAKWA et al., 2007).

Chocolate é consumido em todo o mundo, em todos os segmentos da sociedade e por pessoas de todas as idades. Hoje em dia, o consumidor preocupa-se cada vez mais com o valor nutricional dos alimentos, e levando-se em consideração que o chocolate é uma fonte extremamente rica de muitos minerais essenciais, ele pode contribuir para uma dieta saudável. No entanto, a predição correta da ingestão destes nutrientes é uma tarefa muito complexa (BORCHERS et al., 2000). Os dados nutricionais disponíveis são freqüentemente antigos e incompletos e, em muitos casos, não confiáveis, devido à falta de descrição dos procedimentos analíticos (RIBEIRO et al., 2003).

A literatura relata métodos de tratamento de amostra de chocolate envolvendo digestão via úmida e seca, além do uso de microondas (SEPE et al., 2001; DAHIYA et al., 2005; JALBANI et al., 2007; GÜLDAS, 2008). Normalmente, ácidos e peróxidos são adicionados para melhorar a decomposição da amostra.

O objetivo do presente estudo foi investigar o uso de emulsões como procedimento de preparação de amostras para determinação rotineira de Na, K, CA, Mg, Zn e Fe em chocolates por FAAS. A emulsificação direta das amostras com tensoativos propicia um procedimento rápido para a preparação de amostra, uma vez que não requer qualquer destruição da matriz orgânica (SANZ-MEDEL et al., 1999).

#### 5.2.3.1 Desenvolvimento do método

Idealmente, uma única emulsão deveria ser usada para determinação de todos os elementos, porém, isto não foi possível, principalmente devido a (i) a presença dos analitos como contaminantes em surfactantes e em componentes oleosos e (ii) devido a diferentes faixas de concentrações dos metais nas amostras. Com base nestes critérios,

os metais que poderiam ser determinados na mesma emulsão são mostrados na Tabela 8.

TABELA 8 - Quantidade de amostra de chocolate e composição das formulações otimizadas para a determinação dos metais por FAAS.

Elemento	Quantidade de amostra (%)			Componentes da emulsão			
	Branco	Ao leite	Preto	Fase oleosa	%	Surfactante	%
Na	0,2	0,2	0,2	Estearato de octila	4,0	Triton X100	4,0
K, Ca e Mg	0,2	0,2	0,2	Estearato de octila	4,0	Tween 80	4,0
Fe	8,0	2,0	2,0	Estearato de octila	4,0	Triton X100	4,0
Zn	4,0	2,0	2,0	Estearato de octila	4,0	Tween 80	4,0

O método proposto foi validado para seis metais (Na, K, CA, Mg, Zn e Fe). As figuras de mérito apresentados foram linearidade das curvas analíticas, exatidão e precisão. Além disso, a sensibilidade foi determinada pela concentração característica ( $C_0$ ).

As vantagens do procedimento de emulsificação para amostras gordurosas são descritas na literatura. Quando corretamente estabilizada, a amostra emulsificada é compatível com a maioria da instrumentação analítica, permitindo o uso de procedimentos de calibração simples devido, à minimização de interferências (SANZ-MEDEL et al., 1999). Neste estudo, calibração com soluções de calibração aquosas foi possível e as faixas de linearidade foram selecionadas conforme as concentrações de metais esperadas nas reais amostras. Curvas analíticas avaliadas através de análise de regressão linear, os resultados são mostrados na Tabela 9. Em todos os casos, o intervalo linear foi adequado para o propósito. A Tabela 9 apresenta também os valores encontrados de concentração característica para todos os elementos.

TABELA 9 - Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metais em amostras de chocolate emulsionadas por FAAS.

Metal	Intervalo linear (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da regressão <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	C <sub>0</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Na	1 – 3	$A=(0.0087+0.2839 C)/(1+0.0558 C)$	0.9951	0.015
K	1 - 10	$A=0.0619+0.1834 C$	0.9938	0.024
Ca	0.5 - 8	$A=0.0039+0.0996 C$	0.9994	0.044
Mg	0.5 – 4.0	$A=(0.0124+0.2359 C)/(1+0.1682 C)$	0.9912	0.019
Zn	0.05 – 0.40	$A=0.0015+0.2312 C$	0.9958	0.018
Fe	0.1 – 2.0	$A=0.0014 +0.0228 C$	0.9977	0.191

<sup>a</sup>Absorvância; C (mg L<sup>-1</sup>)=concentração do elemento na solução padrão

A exatidão do método foi posteriormente confirmada pela determinação dos metais no MRC Baking Chocolate. Os resultados são mostrados na Tabela 10. A comparação estatística pelo teste *t* mostrou que não houve nenhuma diferença significativa entre os valores obtidos com o método proposto e os valores certificados.

A precisão dos procedimentos foi determinada através da repetibilidade (precisão intra-dia). Foram analisadas seis emulsões de chocolate no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária (entre-dias) foi avaliada analisando emulsões preparadas em três dias diferentes (n=3). A repetibilidade apresentou bons valores de DPR para todos os metais. A precisão intermediária foi avaliada usando o DPR e teste *F*. Os valores de *F* calculados foram menores que os valores tabelados, indicando que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos em dias diferentes. Todos os dados de precisão são mostrados na Tabela 10.

TABELA 10 - Determinação dos analitos no material de referência certificado Baking Chocolate (NIST SRM 2384) e dados da precisão do método.

Elemento	Componentes da emulsão				Concentração $\mu\text{g g}^{-1}$		Recuperação (%)	$t_{\text{exp}}^c$	Precisão	
	Fase oleosa	%	Surfactante	%	Valor certificado <sup>a</sup>	Encontrado <sup>b</sup>			Intra dia (RSD)	Entre dias (RSD/ $F_{\text{exp}}^d$ )
Na	Estearato de octila	4,0	Triton X100	4,0	40 ± 2	41 ± 2	103	0,04	3,8	1,0/0,34
K	Estearato de octila	4,0	Tween 80	4,0	8200 ± 500	7266 ± 182	89	0,09	2,3	2,3/0,69
Ca	Estearato de octila	4,0	Tween 80	4,0	840 ± 74	882 ± 11	105	0,04	1,0	0,3/0,14
Mg	Estearato de octila	4,0	Tween 80	4,0	2570 ± 150	2600 ± 192	101	1,58	0,9	0,7/0,78
Fe	Estearato de octila	4,0	Triton X100	4,0	132 ± 11	129 ± 11	97	0,01	4,6	2,6/0,55
Zn	Estearato de octila	4,0	Tween 80	4,0	36,6 ± 1,7	38,6 ± 2,7	105	0,03	1,2	0,6/0,88

<sup>a</sup>Limite de confiança 95%

<sup>b</sup>Valor médio ± desvio padrão (n=3)

<sup>c</sup> $t_{\text{tab}} = 2,31$  (p 0,05)

<sup>d</sup> $F_{\text{tab}} = 4,26$  (p 0,05)



### 5.2.3.2 Aplicação em amostras reais

O método proposto foi aplicado para determinação dos níveis de Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe em diferentes amostras de chocolates. A análise foi realizada em triplicata, e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) e a Ingestão Adequada (IA) são níveis de ingestão recomendados para indivíduos e são aplicados para a população saudável em geral. A IDR é a ingestão média diária de nutrientes suficiente para obter as necessidades nutricionais de quase todos os indivíduos saudáveis. IA é a ingestão média diária de nutrientes recomendada considerada adequada, porém seus valores são baseados em estimativas. Tanto a IDR como a IA são usadas como meta para as ingestões individuais e assim, ambas representam níveis recomendados de ingestão para indivíduos. No entanto, os valores variam de acordo com fase de vida (Instituto de medicina-IOM, 2004; IOM, 1997 & IOM, 2000). A fim de elucidar como uma porção de chocolate pode contribuir para os aportes da IDR de cada nutriente, a ingestão foi calculada considerando os valores necessários para um homem adulto saudável. A Tabela 12 mostra o percentual de IDR que pode ser fornecida por uma porção de 25 g dos chocolates analisados.

TABELA 11 - Níveis de concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{DP}$ ,  $n=3$ ) em diferentes amostras de chocolate.

Tipo de chocolate	Marca	Teor de cacau %	Na	K	Ca	Mg	Fe	Zn
Branco	1	n.i.	1033 ± 6	3069 ± 21	3990 ± 27	365,6 ± 1,6	1,2 ± 0,1	13,5 ± 0,3
	2	n.i.	1121 ± 2	3473 ± 19	4096 ± 107	403,7 ± 1,8	1,3 ± 0,2	13,5 ± 0,0
	3	27	1411 ± 7	3952 ± 26	4534 ± 92	496,8 ± 9,5	2,2 ± 0,1	13,4 ± 0,3
	4	n.i.	921,0 ± 2,6	2840 ± 14	3404 ± 48	325,7 ± 2,5	1,7 ± 0,4	11,0 ± 0,1
	5	n.i.	940,3 ± 1,4	2745 ± 14	3203 ± 57	334,2 ± 1,9	3,0 ± 0,2	10,3 ± 0,1
Ao leite	6	n.i.	515,2 ± 1,2	2661 ± 13	1813 ± 47	632,7 ± 6,5	16,5 ± 0,5	7,5 ± 0,1
	7	n.i.	450,1 ± 7,2	2769 ± 31	1546 ± 12	736,6 ± 2,8	14,7 ± 0,7	7,7 ± 0,1
	8	32	891,8 ± 3,8	3671 ± 7	2300 ± 18	867,2 ± 1,4	24,8 ± 0,7	9,4 ± 0,1
	9	n.i.	530,8 ± 2,0	2596 ± 12	1744 ± 19	528,6 ± 36,5	27,4 ± 0,3	9,3 ± 0,1
	10	n.i.	932,2 ± 4,4	3368 ± 4	2523 ± 33	714,3 ± 35,6	19,4 ± 0,2	10,7 ± 0,3
Preto	11	n.i.	500,3 ± 1,4	3654 ± 34	665,4 ± 31,3	997,3 ± 11,5	43,3 ± 0,6	12,4 ± 0,1
	12	n.i.	127,7 ± 0,1	3849 ± 31	801,6 ± 3,0	1328 ± 15	36,1 ± 0,5	15,5 ± 0,1
	13	43	59,8 ± 0,1	3718 ± 26	324,4 ± 24,0	1262 ± 7	64,6 ± 1,4	15,4 ± 0,1
	14	n.i.	509,8 ± 2,5	3670 ± 11	730,7 ± 23,3	1036 ± 5	43,0 ± 0,5	12,1 ± 0,1
	15	n.i.	93,1 ± 0,8	3747 ± 9	385,7 ± 12,3	1224 ± 2	35,8 ± 1,1	15,4 ± 0,0
	16	50	496,2 ± 3,0	4932 ± 14	2069 ± 55	1576 ± 37	75,3 ± 1,5	15,8 ± 0,1
	17	70	127,7 ± 0,6	6361 ± 34	692,4 ± 28,4	1834 ± 77	140,8 ± 7,7	23,3 ± 0,1

n.i.: não informado

TABELA 12 – Percentual da Ingestão Diária Recomendada provida por uma porção de 25g dos chocolates analisados.

Metal	Ingestão (mg)	Chocolate					
		Branco Faixa (%)		Ao leite Faixa (%)		Preto Faixa (%)	
Na	1500 <sup>a</sup>	1,5	2,4	0,8	1,6	0,1	0,8
K	2500 <sup>a</sup>	2,7	4,0	2,6	3,7	3,7	6,4
Ca	1000 <sup>a</sup>	8,0	11,3	3,9	6,3	0,8	2,0
Mg	350 <sup>b</sup>	2,3	3,5	3,	6	7	13
Zn	12 <sup>b</sup>	0,3	0,6	3,1	5,7	7,5	30
Fe	11 <sup>b</sup>	2,3	3,1	1,7	2,4	2,8	5,3

<sup>a</sup>IA; <sup>b</sup>IDR

O mineral presente em maior concentração é o potássio (K), com valores variando de 2495 a 6361  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Curiosamente, quanto mais alto o conteúdo de cacau maior foi o nível de K. Potássio é essencial para a manutenção da osmolaridade celular e dos potenciais de membrana; assim, exerce um papel no tônus vascular e em outras rotas bioquímicas relacionadas com a saúde cardiovascular, além disso, existe uma associação inversa entre a ingestão de potássio e a pressão sanguínea. No entanto, em pacientes que apresentam insuficiência renal, sua eliminação é reduzida, a qual pode levar a altos níveis de K com conseqüente perturbação da atividade muscular, principalmente no coração (STEINBERG et al., 2003; IOM, 2004). O teor de potássio em uma porção de 25 g de chocolate ao leite e preto (65 e 160 mg, respectivamente) pode representar 2,6 a 6,4 % da ingestão de um adulto saudável (IOM, 2004).

Sódio, importante elemento para a regulação da pressão arterial humana (IOM, 2004), variou entre 60 e 1400  $\mu\text{g g}^{-1}$ . A concentração de sódio mostrou-se estar diretamente relacionado ao conteúdo de leite e do licor de cacau nos chocolates, no

entanto, ela apresentou também grande variação entre as marcas. Mesmo assim, os valores podem ser considerados relativamente baixos, representando 0,15 a 2,3% da IA para indivíduos saudáveis, em chocolates pretos e brancos, respectivamente (IOM, 2004).

Cálcio desempenha um papel na mediação da contração vascular e vasodilatação, contração muscular, transmissão nervosa e secreção glandular (IOM, 1997). Cálcio também tem sido inversamente associado à pressão sanguínea, embora com menos intensidade que o potássio (STEINBERG et al., 2003). Chocolates contêm concentrações de cálcio, variando de 324 a 4533  $\mu\text{g g}^{-1}$ , sendo os mais altos níveis encontrados nos chocolates brancos. Em uma porção de 25 g de chocolate branco há uma quantidade substancialmente maior de cálcio (113 mg) que no chocolate preto (8 mg). Esta porção de chocolate branco pode fornecer 11% da IA para um adulto saudável (IOM, 1997). Embora este nível não seja significativo, em comparação com outras fontes de alimentos ricos em cálcio, ele pode fazer uma contribuir para o nível geral deste mineral na dieta.

Magnésio catalisa várias reações biológicas, incluindo a síntese de proteínas, transmissão de impulsos nervosos, relaxamento musculares e produção de energia (STEINBERG et al., 2003; PLANELLS et al., 1997). Os chocolates analisados contiveram níveis de 365 a 1834  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Mg, para chocolate branco e preto, respectivamente. Um chocolate preto com 70% de licor de cacau pode fornecer 13% do IDR (350 mg) de magnésio por porção (25 g) (IOM, 1997).

O conteúdo dos componentes minoritários, Fe e Zn, variaram de 1,2 a 140  $\mu\text{g g}^{-1}$  e de 8 a 23  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Para ambos os metais, quanto maior o conteúdo de cacau, maior o teor do metal. Fe e Zn são elementos essenciais para o organismo. Fe é necessário para a homeostase e é indispensável para os sistemas sanguíneo e muscular e o Zn funciona como componente de várias enzimas na manutenção da integridade estrutural de proteínas e na regulação da expressão genética, bem como na função imunológica. A ingestão adulta média, para Fe e Zn, varia entre 12-18 mg/dia e 8-11 mg/dia, respectivamente (IOM, 2000). O chocolate preto pode ser proposto como um veículo potencial para a fortificação de ferro, porque uma porção de 25 g pode fornecer 30% da IDR de adulto saudável.

## **5.2.4 Análise das amostras de óleos margarina e manteigas**

O corpo humano usa óleos e gorduras da dieta para três propósitos: como fonte de energia, como componente estrutural e para sintetizar reguladores biológicos. Em contraste com as gorduras animais, os óleos vegetais são benéficos e populares devido ao menor efeito sobre os níveis de colesterol. Óleos vegetais são essenciais na nutrição e, dependendo das condições regionais, é produzida uma variedade de óleos com diferentes qualidades (MENDIL et al., 2008).

No presente estudo, as concentrações de Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe foram determinadas por F AAS após a emulsificação de amostra. As figuras de mérito apresentadas foram linearidade das curvas analíticas, exatidão e a sensibilidade a qual foi determinada pela concentração característica ( $C_0$ ).

### **5.2.4.1 Desenvolvimento do método**

A calibração foi realizada com soluções de calibração aquosas e a faixa analítica foi selecionada para cobrir a concentração de metal esperada nas reais amostras. As curvas de calibração foram construídas avaliando a relação entre a resposta (altura do pico) e a concentração pela análise de regressão linear, rendendo os resultados mostrados na Tabela 13. Em todos os casos, o ajuste linear foi considerado adequado para o propósito. A Tabela 13 também apresenta os valores das concentrações características ( $C_0$ ) para todos os elementos.

As recuperações das adições de padrões inorgânicos nas amostras são mostradas na Tabela 14 e variaram de 89,7 a 112,3%.

TABELA 13 – Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metal em amostras emulsionadas por F AAS.

Metal	Intervalo linear (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da regressão <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	C <sub>0</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	LD (µg L <sup>-1</sup> )
Na	1,0 – 8,0	$A=(-0,0048+0,1728 C)/(1+0,0446 C)$	0,9980	0,0252	0,03
K	0,2 – 1,0	$A=-0,00085+0,1944 C$	0,9912	0,0224	0,02
Ca	0,2 – 1,0	$A=0,002145+0,118990 C$	0,9957	0,0366	0,08
Mg	0,2 – 1,0	$A=(-0,00223+0,7514 C)/(1+0,3460 C)$	0,9994	0,0058	0,01
Zn	0,05 – 0,4	$A=0,001395+0,21998 C$	0,9928	0,0198	0,02
Fe	0,05 – 1,0	$A=0,000073+0,01146 C$	0,9913	0,3803	0,08

<sup>a</sup>Absorbância; C (mg L<sup>-1</sup>)=concentração do elemento na solução de calibração

TABELA 14 - Resultados da recuperação (%  $\pm$ DP, n=3) dos analitos nas amostras enriquecidas.

Amostra	Origem	Na <sup>a</sup>	K <sup>b</sup>	Ca <sup>b</sup>	Mg <sup>b</sup>	Zn <sup>c</sup>	Fe <sup>c</sup>
Oleo de arroz	Brasil	107,2 $\pm$ 1,4	100,2 $\pm$ 5,3	105,7 $\pm$ 3,1	105,4 $\pm$ 9,2	102,7 $\pm$ 5,3	112,3 $\pm$ 6,5
Oleo de canola	Brasil	92,8 $\pm$ 1,3	97,7 $\pm$ 5,5	99,4 $\pm$ 5,1	96,0 $\pm$ 2,3	97,1 $\pm$ 4,3	105,2 $\pm$ 4,5
Oleo de girasol	Brasil	96,3 $\pm$ 0,7	107,7 $\pm$ 2,5	104,0 $\pm$ 2,5	99,2 $\pm$ 3,2	95,0 $\pm$ 3,1	99,3 $\pm$ 5,1
Oleo de milho	Brasil	89,7 $\pm$ 0,8	101,7 $\pm$ 1,4	97,5 $\pm$ 2,2	103,7 $\pm$ 3,7	95,9 $\pm$ 4,1	99,7 $\pm$ 8,0
Oleo de soja	Brasil	90,8 $\pm$ 1,2	104,6 $\pm$ 8,4	96,6 $\pm$ 0,7	103,4 $\pm$ 1,7	104,2 $\pm$ 3,4	106,0 $\pm$ 5,3
Azeite de oliva	Espanha	89,7 $\pm$ 0,6	97,1 $\pm$ 1,7	95,8 $\pm$ 3,5	101,1 $\pm$ 2,1	99,1 $\pm$ 2,6	102,0 $\pm$ 4,0
Azeite de oliva	Itália	90,4 $\pm$ 1,1	103,3 $\pm$ 7,5	102,1 $\pm$ 1,6	109,5 $\pm$ 2,9	111,1 $\pm$ 6,1	97,7 $\pm$ 3,7
Margarina light	Brasil	102,0 $\pm$ 1,3	104,0 $\pm$ 5,3	103,0 $\pm$ 2,9	99,4 $\pm$ 2,4	105,6 $\pm$ 5,6	102,2 $\pm$ 6,8
Margarina	Brasil	106,4 $\pm$ 2,4	99,8 $\pm$ 3,9	100,8 $\pm$ 1,5	99,5 $\pm$ 1,3	109,9 $\pm$ 5,8	101,9 $\pm$ 4,8
Manteiga	Brasil	92,2 $\pm$ 2,3	104,7 $\pm$ 2,9	96,1 $\pm$ 3,0	106,3 $\pm$ 1,7	91,4 $\pm$ 0,8	100,5 $\pm$ 5,5

<sup>a</sup>1 mg L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>0,5 mg L<sup>-1</sup>

<sup>c</sup>0,2 mg L<sup>-1</sup>

#### 5.2.4.2 Aplicação em amostras reais

Amostras reais de óleos, margarinas e manteigas foram analisadas pelo método proposto para a determinação dos metais e os resultados podem ser vistos na Tabela 15. Existem poucos dados na literatura relativo ao conteúdo de metais em óleo comestíveis, margarinas e manteigas.



TABELA 15 – Níveis de concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de óleos e gorduras comestíveis, n=3

Amostra	Na	K	Ca	Mg	Zn	Fe
Oleo de arroz	0,10 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,01	4,37 $\pm$ 0,12	0,07 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,13	1,86 $\pm$ 0,22
Oleo de canola	0,06 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	1,26 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	1,61 $\pm$ 0,47
Oleo de girasol	0,07 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	2,80 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,04	1,50 $\pm$ 0,38
Oleo de milho	0,23 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,07	1,81 $\pm$ 0,18
Oleo de soja	0,11 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,09	2,98 $\pm$ 0,15
Azeite de oliva	0,28 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,09	2,76 $\pm$ 0,13
Azeite de oliva	0,76 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	1,46 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,13	3,28 $\pm$ 0,49
Margarina light	305,5 $\pm$ 1,2	98,3 $\pm$ 1,2	49,8 $\pm$ 1,2	7,92 $\pm$ 0,13	0,90 $\pm$ 0,05	8,46 $\pm$ 0,19
Margarina	203,1 $\pm$ 0,6	113,0 $\pm$ 0,8	60,3 $\pm$ 0,6	6,50 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,13	9,52 $\pm$ 0,33
Manteiga	46,0 $\pm$ 2,9	117,7 $\pm$ 2,0	125,5 $\pm$ 3,1	8,40 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,11	9,82 $\pm$ 0,78

## **5.3 Determinações de metais por GFAAS**

### **5.3.1 Determinação de Se em ovos**

Selênio (Se) é um elemento traço essencial para animais e humanos. Está relacionado à proteção de tecidos contra o estresse oxidativo, na defesa contra infecções, e na modulação do crescimento e desenvolvimento. A deficiência crônica de Se pode aumentar a suscetibilidade a infecções viróticas, cânceres, doenças cardiovasculares, disfunções da tiróide e condições inflamatórias diversas. Porém, o consumo excessivo pode causar efeitos prejudiciais no organismo (WHO, 2004).

Os alimentos são a principal fonte de selênio, e o conteúdo deste elemento está relacionado com a origem do alimento e o seu processamento. Há um uso difundido de suplementação de selênio através do enriquecimento de rações para animais com selenito de sódio ou selênio orgânico (JIAKUI & XIAOLONG, 2004). Ovos são de grande importância, pois além de seu alto valor nutricional, podem prover até 50% da ingestão diária de Se necessária em humanos em formas biologicamente ativas de Se (GOLUBKINA & PAPAZYAN, 2006). Além disso, ovos Se-enriquecidos tem sido desenvolvidos e introduzidos em vários mercados tornando-se populares (BARGELLINI et al., 2008).

Devido à sua importância nutricional e em especial à dicotomia entre essencialidade/toxicidade do selênio, há numerosos procedimentos para sua determinação em amostras biológicas e, especialmente, em alimentos (VIÑAS et al., 2000). Este elemento é frequentemente determinado através de Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GF AAS) ou Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos (HG AAS) (WELZ & SPERLING, 1999). A escolha depende da composição da matriz e das espécies de selênio apresentadas na amostra (BOHRER et al., 2007). Enquanto a resposta do HG AAS é fortemente dependente da forma do selênio, GF AAS é adequado para a medida de ambas as espécies orgânicas e inorgânicas.

Métodos para determinar elementos traços deveriam envolver manipulação mínima da amostra; porém, a literatura para determinação de selênio em ovos relata métodos de tratamento de amostra envolvendo digestão com ácidos e peróxidos

(PAPPAS et al., 2006; PAN et al., 2007), e alguns tentam melhorar a digestão da amostra combinando o uso destes reagentes com radiação ultravioleta (MANJUSHA et al., 2007) ou microondas (JIAKUI & XIAOLONG, 2004; BURGER & GOCHFELD, 2003). Isto resulta em passos adicionais, que podem levar a inconvenientes como erros de amostragem, contaminação e perdas durante manipulação da amostra (GOLUBKINA & PAPAZYAN, 2006). Além disso, ácidos podem interferir nas medidas por HG AAS e GF AAS e, então, resultados inexatos para a determinação de selênio podem ser atribuídos devido à resistência dos compostos de selênio à oxidação e devido à volatilidade de espécies de selênio presentes ou formados (WELZ & SPERLING, 1999).

O ovo é um sistema naturalmente emulsionado, com componentes como fosfolipídios, lipoproteínas e proteínas (MINE, 1998; KIOSSEOGLOU, 2003); porém, devido à sua alta viscosidade e ao seu alto conteúdo de matéria orgânica a introdução direta no forno para a medida por GF AAS é particularmente difícil. Emulsificação direta com surfactantes é um procedimento rápido para preparação de amostra, porque não requer destruição da matriz orgânica (SANZ-MEDEL et al., 1999). O propósito deste estudo foi desenvolver um método para determinação de Se por GF AAS em ovos de galinha preparando um sistema emulsionado contendo surfactante, amostra, óleo e água.

#### 5.3.1.1 Desenvolvimento do método

##### a) Determinação das condições analíticas

A fim de encontrar as condições apropriadas para a determinação do Se, foram estabelecidas as curvas de pirólise e atomização usando soluções aquosas e emulsões branco enriquecidas com Se aquoso (Figura 4.1.1). Para determinação de Se em solução aquosa sem o uso de modificador químico, temperatura de pirólise ao redor de 600 °C mostrou-se melhor por prevenir perda do analito. É evidente a partir destas curvas que o modificador químico permite usar temperaturas de pirólise

relativamente altas (1100 °C), potencializando a redução dos efeitos da matriz. Porém, em um meio emulsionado, o modificador pareceu não influenciar significativamente na pirólise do Se. Com o modificador, a maior sensibilidade foi em uma temperatura de atomização de 2100 °C, tanto em solução aquosa como em emulsão. O programa de temperatura otimizado neste estudo está apresentado na Tabela 4.1.1. Três passos de secagem garantiram secagem completa das soluções de calibração e amostras emulsionadas e propiciou um depósito sólido uniforme na superfície da plataforma do atomizador.

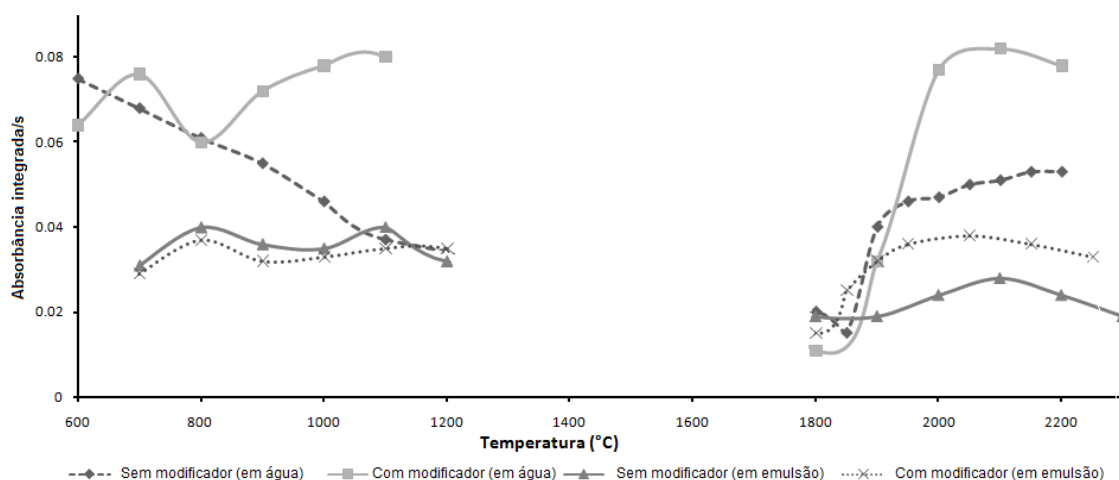


FIGURA 3 - Curvas de pirólise e atomização para Se em água e em emulsão. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1100 °C; volume de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> = 5 µL; Se = 500 pg.

Como a medida de Se na amostra emulsionada apresentou menor sensibilidade comparada aos padrões aquosos, foram realizados experimentos adicionais para confirmar a recuperação tanto de Se orgânico quanto inorgânico. Em uma emulsão branco foram adicionados 50 µg L<sup>-1</sup> de Se inorgânico e 50 µg L<sup>-1</sup> de Se-metionina, e o Se foi medido seguindo o programa de temperatura descrito na Tabela 4.1.1 Adicionalmente, uma curva de pirólise foi obtida (segundo as condições descritas na Figura 4.1.1) usando uma emulsão de amostra de ovo igualmente adicionada com ambas as espécies. As recuperações da emulsão branco adicionada com o elemento demonstraram que os componentes da formulação, isto é, óleo de milho e surfactante, não interferiu na atomização do Se durante a medida por GF AAS, considerando que uma recuperação de 110 ±4,6 µg

L<sup>-1</sup> foi encontrada. Os resultados são apresentados na Figura 4.1.2 que mostra as recuperações obtidas a cada temperatura. Os valores mostram que ambas as espécies de Se são estabilizadas mesmo em altas temperaturas. Embora menos sensível, as curvas de pirólise e atomização das amostras emulsionadas mostraram-se homogêneas mostrando que o analito é bem estabilizado nas condições selecionadas para a medida.

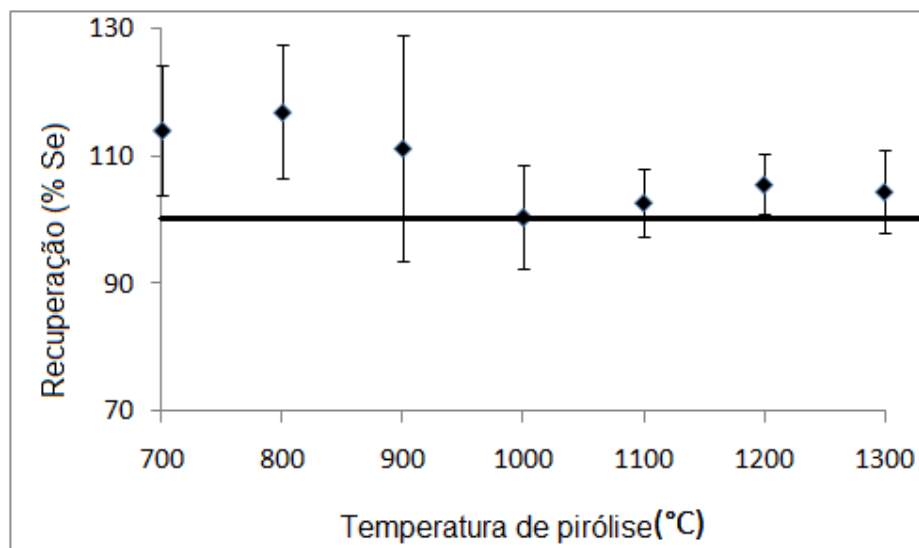


FIGURA 4 - Recuperações (%) em diferentes temperaturas de pirólise (°C) para uma amostra de ovo adicionada com Se inorgânico 50 µg L<sup>-1</sup> e com Se-metionina 50 µg L<sup>-1</sup>. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C. Volume de Pd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> = 5 µL.

Os parâmetros otimizados para as determinações de Se por GF AAS são mostrados na Tabela 16.

TABELA 16 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura/ tempo para determinação de Se nas amostras de ovos emulsionadas.

Parâmetros			
Corrente da lâmpada (mA)			6,0
Comprimento de onda (nm)			196,0
Fenda espectral (nm)			1,2
Vazão de argônio (L min <sup>-1</sup> )			2
Volume de amostra (µL)			10
Volume do modificador Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (µL)			5
Programa de temperatura (°C)		Rampa (°C/s)	Tempo de permanência (s)
Secagem	90	5	10
Secagem	105	3	20
Secagem	300	50	10
Pirólise	1100	50	5
Atomização	2100	1400	4
Limpeza	2300	500	4

b) Características de desempenho do método

O método foi validado pela determinação das seguintes características operacionais: linearidade, precisão e exatidão. As figuras de mérito estão resumidas na Tabela 17.

A calibração pelo método da adição foi usada para eliminar interferências, pois a curva é calculada nas mesmas condições das amostras. A calibração seguiu a equação:  $y=b+a [\text{Se}]$  ( $y=0,00055+0,0055 [\text{Se}]$ ), e  $[\text{Se}]$  é a concentração de selênio na faixa de 0-25,0 µg L<sup>-1</sup>. Os dados de linearidade validados por análise de variância

(ANOVA) confirmaram o ajuste linear da regressão e nenhum desvio significativo da linearidade ( $P < 0,05$ ).

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (precisão intra-dia) e pela reprodutibilidade ou precisão intermediária (entre-dia). Para a repetibilidade seis emulsões de ovos com a mesma concentração de amostra ( $40,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. E a precisão intermediária foi avaliada analisando emulsões preparadas em três dias diferentes ( $n=3$ ). O desvio padrão relativo (DPR) obtido para todas as amostras foi 4,5% indicando boa precisão e mostrando a repetibilidade do método. A precisão intermediária foi avaliada usando DPR e  $F$ -teste. O DPR foi de 3,4% e o valor de  $F$  calculado foi de 0,75 ( $F_{\text{tabelado}}=4,26$ ), não indicando nenhuma diferença significativa entre os resultados obtidos em dias diferentes.

A exatidão foi avaliada adicionando quantidades conhecidas de material de referência certificado ( $100,0 \text{ mg}$ ) na emulsão branco ( $50 \text{ mL}$ ). Os valores encontrados pelo método ( $1,32 \pm 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram concordantes com os valores declarados no MRC ( $1,39 \pm 0,17 \text{ mg kg}^{-1}$ ). No teste  $t$  de Student o valor de  $t$  calculado foi de 0,90; sendo mais baixo que o valor de  $t$  tabelado de 2,31 ( $P < 0,05$ ), não indicando nenhuma diferença significativa entre a concentração medida e a certificada.

O limite de detecção (LD) foi de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , e foi baseado em 3,3 vezes o desvio padrão do intercepto dividido pela inclinação da curva. A massa característica foi de  $80 \text{ pg}$ .

TABELA 17 – Características de desempenho do método para determinação de Se em amostras de ovos emulsionadas por GF AAS.

Parâmetros	Resultados <sup>a</sup>
Faixa analítica $\mu\text{g L}^{-1}$	0 – 25
Inclinação da curva $\pm$ desvio padrão	$0,0005 \pm 1,2 \times 10^{-5}$
Intercepto $\pm$ desvio padrão	$0,005 \pm 1,7 \times 10^{-4}$
Limite de confiança da inclinação da curva <sup>b</sup>	0,00052 to 0,00058
Limite de confiança do intercepto da curva <sup>b</sup>	0,0051 to 0,0060
Coeficiente de correlação (r)	0,9980
LD	$1 \mu\text{g L}^{-1}$
$m_0$	80 pg
Repetibilidade (%)	
DPR (n=6)	4,5
Precisão Intermediária (%)	
DPR (n=3)	3,4
F ( $p=0,05$ )	0,75 (4,26 <sup>c</sup> )
Análise de variância	
Regressão linear	71,60 (4,96 <sup>c</sup> )
Desvio da linearidade	0,04 (3,71 <sup>c</sup> )

<sup>a</sup> Dados obtidos a partir de cinco curvas de calibração

<sup>b</sup> Limite de confiança 95%

<sup>c</sup> Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de F para  $P = 0,05$ .

### 5.3.1.2 Aplicação em amostras reais

Cinquenta aves fêmeas reprodutoras Cobb 500 com 22 semanas de idade foram pesadas e selecionadas antes do alojamento. Cada ave foi colocada individualmente em uma gaiola de arame com dimensões de 33x46x40 cm. As galinhas foram alimentadas com dieta basal contendo suplementação de Se durante 25 semanas e, então, foram determinados cinco tratamentos (n=10) compostos ou de selenito de sódio (inorgânico) ou de Zn-L-Se-metionina (orgânico) ou de uma mistura dos dois. As dietas foram como segue: T1 = 0,15% inorgânico; T2 = 0,30% inorgânico; T3 = 0,15% orgânico; T4 = 0,30% orgânico; T5 = 0,15% inorgânico e



0,15% orgânico. As amostras de ovos foram conservadas congeladas (-18°C) até a análise.

A Tabela 18 resume os resultados encontrados para os diferentes tratamentos. O conteúdo de Se nos ovos das galinhas alimentadas com Se orgânico foi mais alto que os outros tratamentos. Concluí-se que os conteúdos de Se em ovos se assemelham aos níveis adicionados ao alimento, mas Zn-L-Se-metionina provou ser o mais efetivo.

TABELA 18 - Determinação de Se em ovos oriundos de galinhas tratadas com suplementação de Se.

Amostras (n=10)	Tratamento (%)	Resultados (Se mg kg <sup>-1</sup> )
T1	0,15 Se inorgânico	0,19 ±0,05
T2	0,30 Se inorgânico	0,20 ±0,04
T3	0,15 Se orgânico	0,24 ±0,06
T4	0,30 Se orgânico	0,35 ±0,07
T5	0,15 Se orgânico + 0,15 Se inorgânico	0,31 ±0,07

### 5.3.2 Determinação de elementos traços em óleos vegetais, margarina e manteiga por GF AAS

Além da importância deles no metabolismo humano, elementos traços fazem um papel importante na caracterização de óleo e na detecção de adulterações nos óleos (ZEINER et al., 2005; BENINCASA et al., 2007). A qualidade de gorduras e óleos comestíveis está relacionada diretamente à sua concentração em metais traços. A fonte primária de espécies metálicas é o ambiente, embora também devam ser considerados o processamento e o armazenamento de óleos e gorduras (DE SOUZA et al., 2005; BENINCASA et al., 2007). Traços metálicos em óleos comestíveis são conhecidos por terem um efeito na sua taxa de oxidação dos óleos, diminuindo a vida de prateleira de produtos comerciais (MURILLO et al., 1999). Além de causar rancidez prematura, estes processos de oxidação podem gerar peróxidos, aldeídos, cetonas, ácidos, epóxidos e outros compostos que podem produzir efeitos patológicos no sistema digestivo e também podem reagir com componentes dos alimentos (proteínas e corantes), sensibilizando a ação de alguns carcinogênicos (CASTILLO et al., 1999).

O desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e exatos para a determinação da concentração de metais em óleos e gorduras comestíveis ainda é um desafio no controle de qualidade de alimentos, devido a baixas concentrações de alguns elementos e às dificuldades que surgem devido às características da matriz (ANSARI et al., 2009). Somente poucos métodos, específicos para óleos comestíveis, podem ser encontrados na literatura. Embora o uso de espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP, do inglês *Inductively coupled plasma*) para a análise de óleos comestíveis tenha aumentado nos últimos anos (ALLEN et al., 1998; MURILLO et al., 1999; CASTILLO et al., 1999; HUANG & JIANG, 2001; JIMENEZ et al., 2003; ANTHEMIDIS et al., 2005; DE SOUZA et al., 2005; ZEINER et al., 2005; BENINCASA et al., 2007; CINDRIC et al., 2007), a espectrometria de absorção atômica ainda é a mais empregada entre as citadas e é a técnica de escolha em alguns métodos oficiais (SUN, 1989; CARBONELL et al., 1991; VAN DALEN, 1996; ALLEN et al., 1998; CHEN et al., 1999; DE LEONARDIS et al., 2000; LENDINEZ et al., 2001;

ZEINER et al., 2005; REYES & CAMPOS, 2006; CINDRIC et al., 2007; MENDIL et al., 2008; BAKKALI et al., 2009; ANSARI et al., 2009). A maioria dos métodos requer pré-tratamentos da amostra. Várias técnicas, incluindo extração, solubilização, pré-concentração, diluição e digestão com microondas são usadas para reduzir a influência da matriz orgânica. Na maioria dos casos, estes pré-tratamentos consomem tempo, com o risco conseqüente de contaminação da amostra e perda de analito, devido à formação de compostos voláteis (HUANG & JIANG, 2001; ANSARI et al., 2009).

Emulsões já foram aplicadas para determinação de metais em óleos e gorduras comestíveis por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP) (CASTILLO et al., 1999; MURILLO et al., 1999; ANTHEMIDIS et al., 2005; JIMENEZ et al., 2003; DE SOUZA et al., 2005), mas sua aplicação na análise de óleos comestíveis por AAS ainda não foi relatada. No presente estudo, foi determinada a concentração de metais em óleos vegetais, margarinas e manteigas, por GF AAS, após a emulsificação das amostras.

#### 5.3.2.1 Desenvolvimento do método

##### a) Determinação das condições analíticas

Curvas de pirólise e atomização foram estabelecidas usando soluções aquosas ou emulsões de amostras adicionadas de padrão aquoso inorgânico para encontrar as condições apropriadas para a determinação para cada analito. Além disso, a influência dos modificadores foi também investigada, conforme descrito a seguir para cada elemento.

## Arsênio

A Figura 5 mostra as curvas de pirólise e atomização que foram construídas para avaliar a influência dos modificadores na determinação de As. Os modificadores analisados foram: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL) e Ni 50 ppm (10 μL); (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e Ni 50 ppm (2 μL); (3): Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e (4) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (3 μL) e Ni 50 ppm (3 μL). O modificador composto por níquel e nitrato de paládio foi o que proporcionou uma maior sensibilidade nas determinações de As.

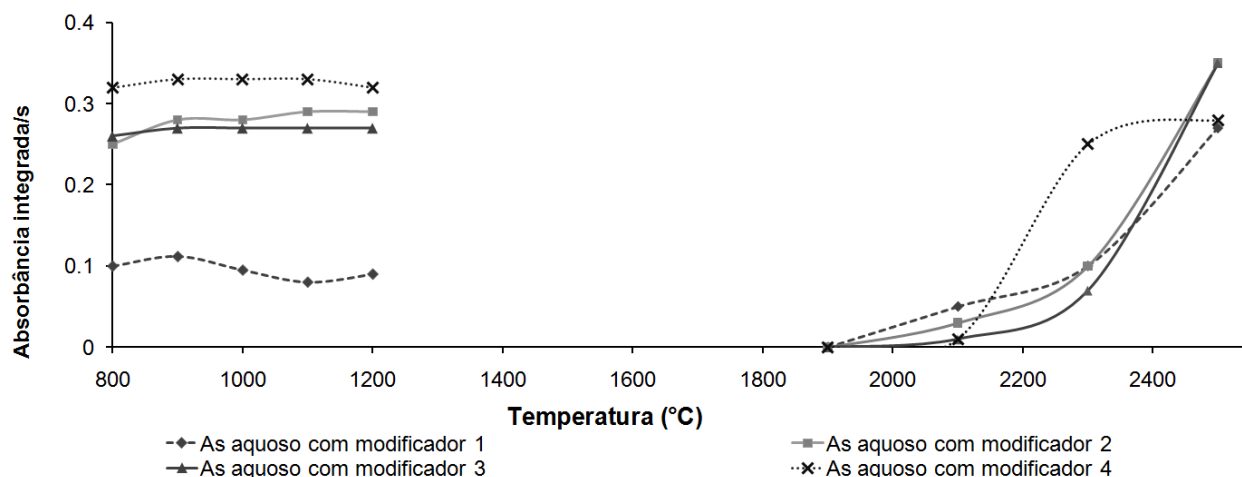


FIGURA 5 - Curvas de pirólise e atomização para As aquoso. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2400 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1400 °C. Modificadores avaliados: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL) e Ni 50 ppm (10 μL); (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e Ni 50 ppm (2 μL); (3): Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e (4) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (3 μL) e Ni 50 ppm (3 μL). As = 2000 pg.

## Cádmio

A Figura 6 mostra as curvas de pirólise e atomização que foram construídas para avaliar a influência dos modificadores sobre a determinação de Cd em amostras emulsionadas. Os modificadores analisados foram: (1) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 μL), (2) mistura de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL) e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL) e (3) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL). O modificador 3, composto

somente de nitrato de paládio, foi o que proporcionou uma maior sensibilidade nas determinações de Cd.

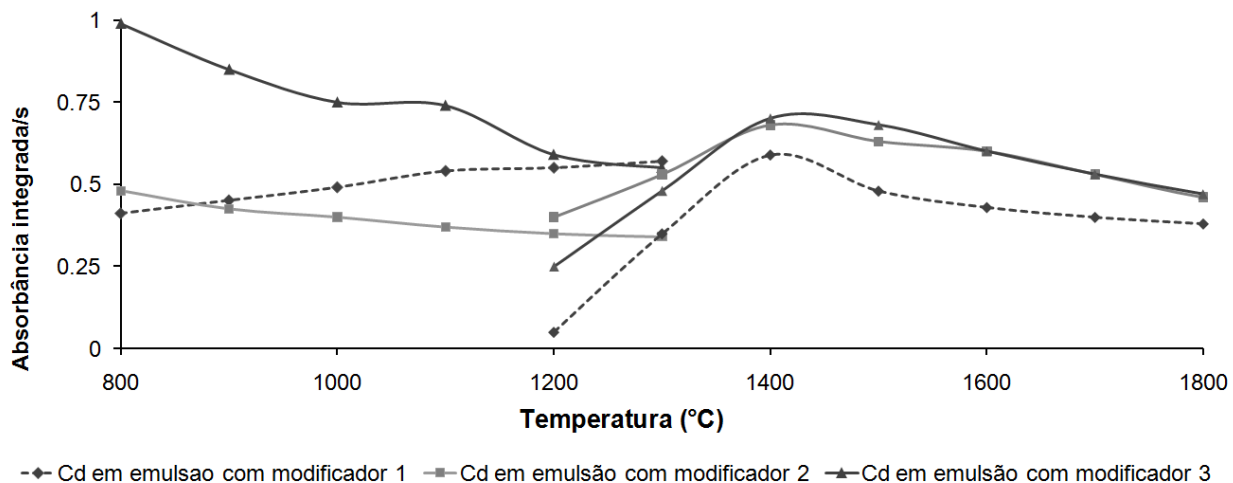


FIGURA 6 - Curvas de pirólise e atomização de emulsão de amostra de azeite de oliva enriquecida com Cd. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 1400 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 900 °C. Modificadores: (1)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (5  $\mu\text{L}$ ); (2)  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  (2  $\mu\text{L}$ ) e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (2  $\mu\text{L}$ ); e (3)  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  (5  $\mu\text{L}$ ). Cd = 280 pg.

### Chumbo

Para determinação de chumbo foram construídas curvas de pirólise e atomização avaliando a influência de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  (5  $\mu\text{L}$ ) como modificador e de uma mistura de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  (2  $\mu\text{L}$ ) e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (2  $\mu\text{L}$ ). Primeiro foram construídas as curvas de pirólise e atomização de Pb aquoso e em solução contendo o tensoativo Tween 80 (Figura 7). As curvas de atomização com o modificador constituído de nitrato de paládio e magnésio foram as que apresentaram um sinal mais estável.

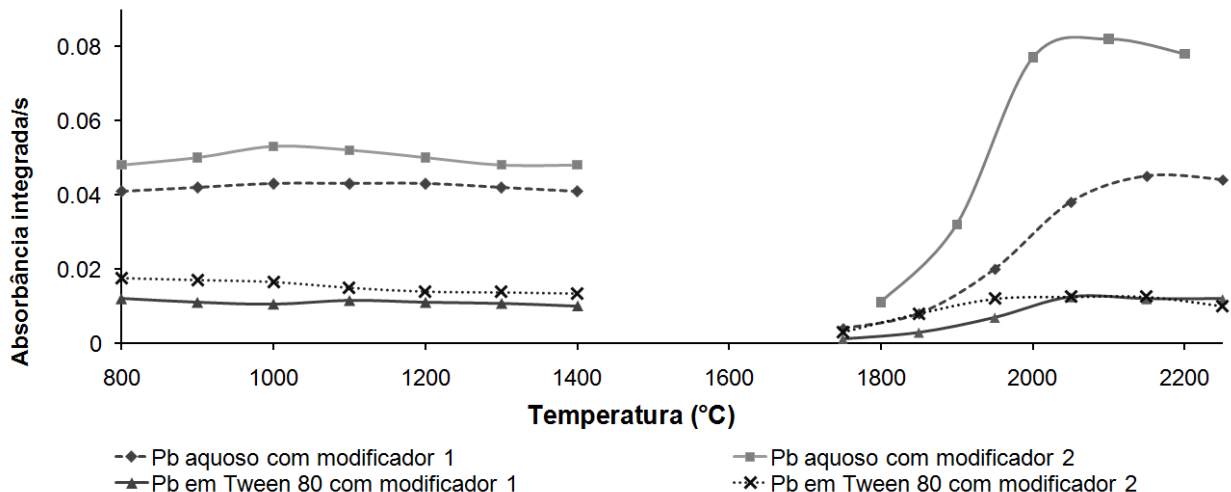


FIGURA 7 - Curvas de pirólise e atomização para Pb aquoso e Pb em solução contendo 4% de Tween 80. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2100 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 900 °C. Modificadores: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL); e (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL) e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL). Pb = 250 pg.

Foram construídas as curvas de pirólise e atomização de Pb sobre emulsões de amostras de azeite de oliva e de margarina para avaliar a influência da matriz e dos modificadores (Figura 8). Nos dois tipos de amostras, o uso de modificador contendo mistura de nitrato de paládio e magnésio proporcionou maior sensibilidade nas determinações. As temperaturas consideradas mais adequadas para as determinações de Pd foram 900 °C e 2100 °C, respectivamente para pirólise e atomização.

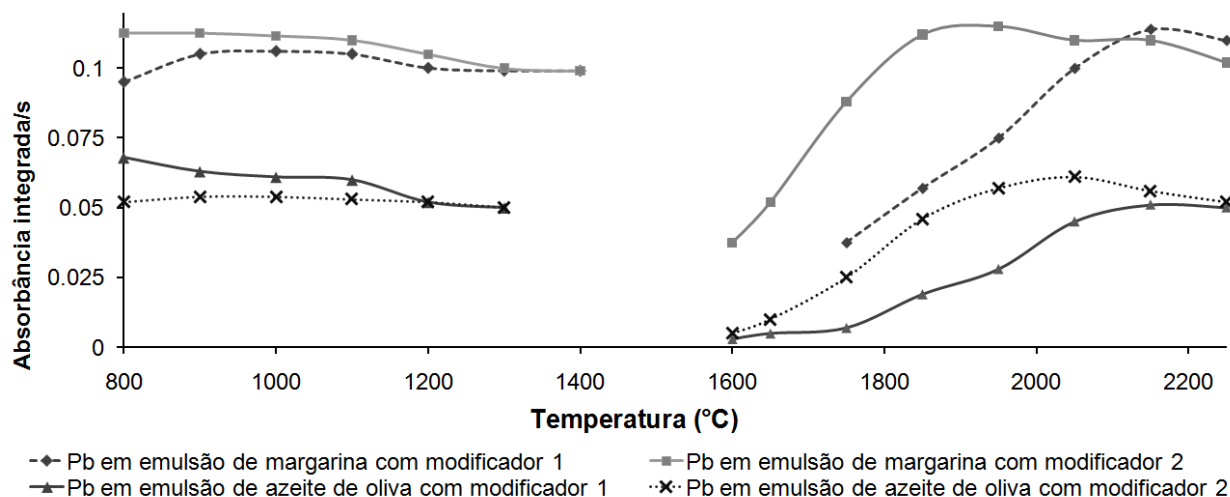


FIGURA 8 - Curvas de pirólise e atomização para Pb adicionados sobre emulsões de amostras de azeite de oliva e margarina. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2100 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 900 °C. Modificadores: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL); e (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL) e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 μL). Pb na emulsão de margarina = 680 pg. Pb na emulsão de azeite de oliva = 250 pg.

## Cobre

Primeiramente, foram construídas curvas de pirólise e atomização para avaliar a influência dos modificadores sobre a determinação de Cu em meio aquoso (Figura 9). Os modificadores analisados foram: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> / Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL/5 μL) e (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> / ácido ascórbico (5 μL/5 μL).

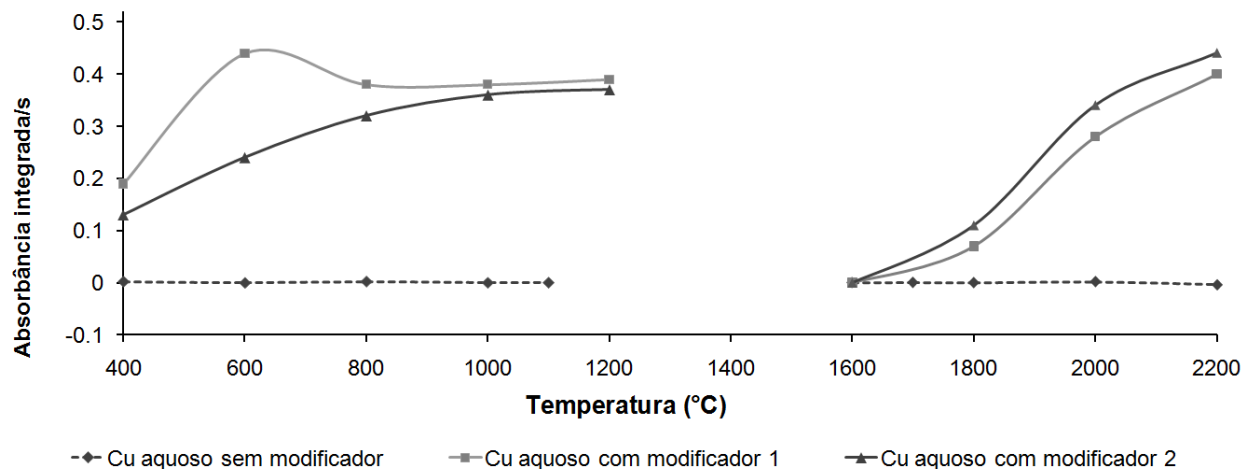


FIGURA 9 - Curvas de pirólise e atomização de Cu aquoso. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Modificador 1: Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL); e modificador 2: Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e ácido ascórbico 2 g% (5 μL). Cu = 250 pg.

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para Cu adicionado sobre emulsões de amostras de azeite de oliva e margarina para avaliar a influência dos modificadores e da matriz (Figura 10). Os modificadores analisados foram: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> / Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL/5 μL) e (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/ácido ascórbico (5 μL/5 μL). Os modificadores apresentaram do comportamento semelhante sobre as determinações, assim, o modificador escolhido para as determinações foi o modificador composto de paládio e magnésio.



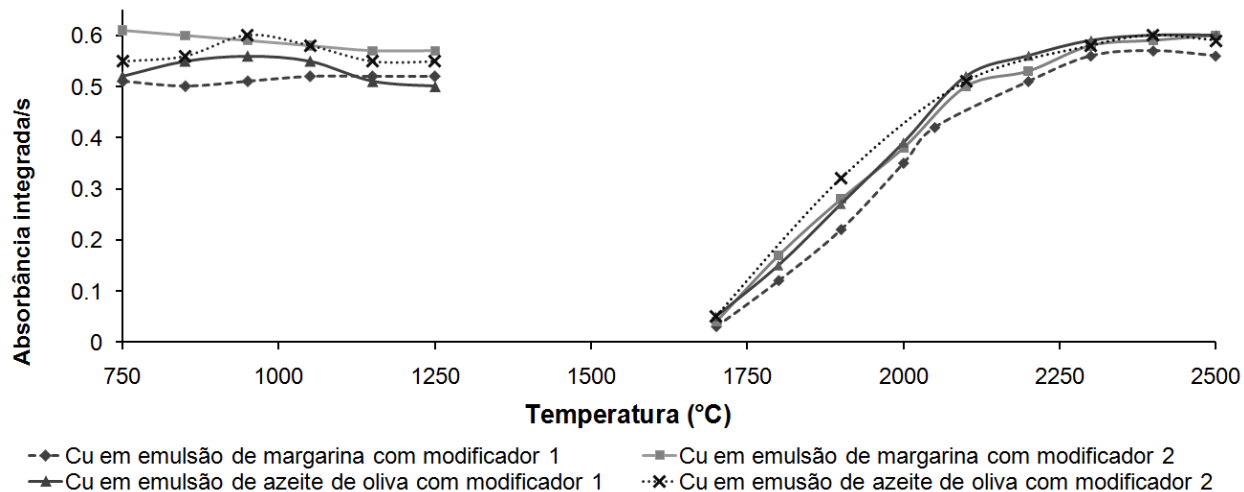


FIGURA 10 - Curvas de pirólise e atomização para Cu adicionado sobre emulsões de amostras de azeite de oliva e margarina. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Modificadores: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL); e (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e ácido ascórbico 2 g% (5 μL). Cu = 250 pg.

## Cromo

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para Cr aquoso e com emulsões de amostras adicionadas de padrão inorgânico de Cr para avaliar a influência dos modificadores e da matriz (Figura 10). Os modificadores analisados foram: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 μL) e (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/ácido ascórbico (5 μL/5 μL). Os modificadores apresentaram comportamento semelhante sobre as determinações, assim, o modificador escolhido para as determinações foi o modificador composto somente de nitrato de paládio.

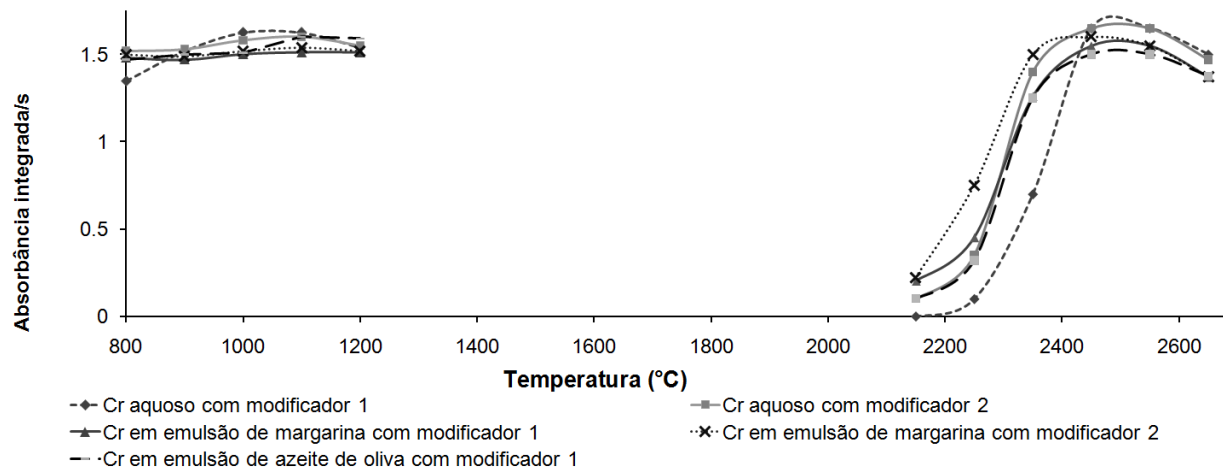


FIGURA 11 - Curvas de pirólise e atomização para Cr aquoso e adicionados sobre emulsões de amostras. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2200 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Modificadores: (1) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 µL); e (2) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 µL).e ácido ascórbico 2 g% (5 µL). Cr = 1000 pg.

## Manganês

Foram construídas as curvas de pirólise e atomização para o Mn sobre emulsões de amostras para avaliar a influência da matriz e do modificador nitrato de paládio (Figura 12). Em ambas as amostras, o uso de modificador gerou uma diminuição da sensibilidade das determinações. As temperaturas consideradas mais adequadas para as determinações de Mn foram 1400 °C e 2400 °C, respectivamente para pirólise e atomização.

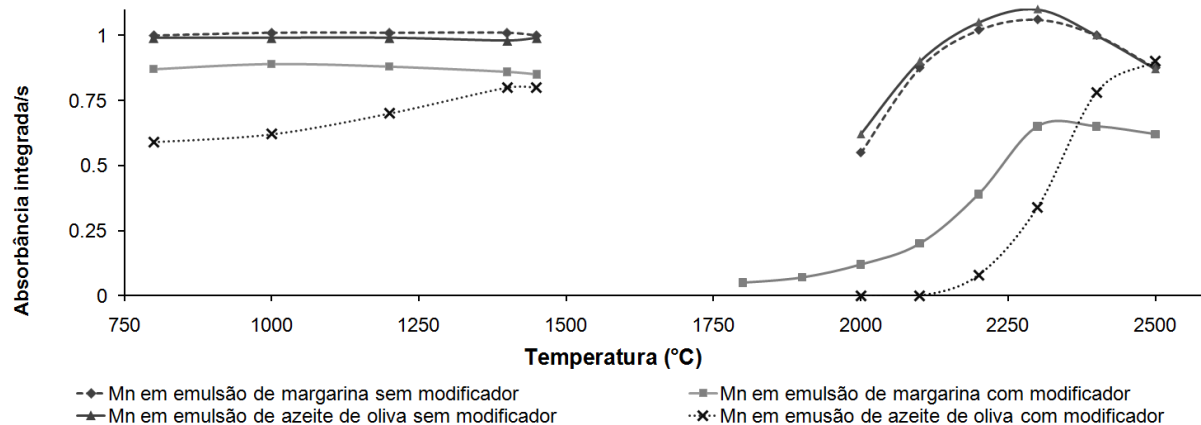


FIGURA 12 - Curvas de pirólise e atomização para Mn adicionados sobre emulsões de amostras de margarina e de azeite de oliva. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2400 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1400 °C. As curvas foram construídas sem modificador e com o uso de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (5 µL) como modificador químico. Mn = 500 pg.

### Níquel

As curvas de pirólise e atomização para o Ni foram contruídas com o padrão adicionado sobre emulsões de amostras de margarina e de azeite de oliva estabelecer o melhor programa de temperatura (Figura 13). As temperaturas consideradas mais adequadas para as determinações de Mn foram 1000 °C e 2500 °C, respectivamente para pirólise e atomização.

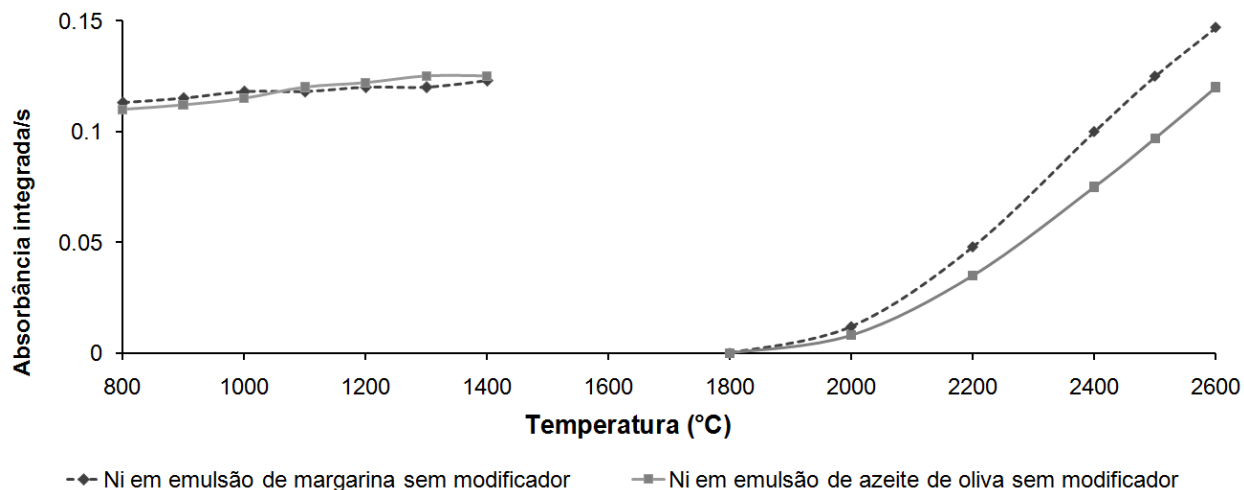


FIGURA 13 - Curvas de pirólise e atomização para Ni adicionados sobre emulsões de amostras de margarina e de azeite de oliva, sem o uso de modificador químico. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2500 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1000 °C. Ni=500 pg.

A Tabela 19 sumariza as condições analíticas selecionados após a análise dos resultados encontrados para cada elemento. Esta tabela mostra o programa de temperatura desenvolvido para cada metal, sendo que três passos garantiram secagem completa dos padrões e amostras emulsionados.

TABELA 19 - Parâmetros instrumentais para a determinação de metais por GF AAS nas amostras emulsionadas

	Cr	Mn	Pb	Ni	Cd	As	Cu
Comprimento de onda (nm)	357,9	279,5	283,3	232,0	228,8	193,7	324,8
Modificador I (Volume - µL)	Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)	-	Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2)	-	Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)	Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (3)	Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)
Modificador II (Volume - µL)			Mg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2)			Ni (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)	Mg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)
Programa de temperatura °C (tempo da rampa (s), tempo de permanência (s))							
Secagem	90 (5, 20)	90 (5, 20)	90 (5, 20)	90 (5, 20)	90 (5, 20)	90 (5, 20)	90 (5, 20)
Secagem	105 (3, 20)	105 (3, 20)	105 (3, 20)	105 (3, 20)	105 (3, 20)	105 (3, 20)	105 (3, 20)
Secagem	110 (2, 10)	110 (2, 10)	110 (2, 10)	110 (2, 10)	110 (2, 10)	110 (2, 10)	120 (2, 10)
Pirólise	900 (250, 10)	1400 (250, 10)	900 (250, 10)	1000 (250, 10)	1000 (250, 10)	1000 (250, 10)	1000 (250, 10)
Atomização	2600 (1500, 5)	2400 (1500, 4)	2100 (1500, 4)	2500 (1500, 5)	1400 (1500, 3)	2400 (1500, 4)	2500 (1500, 4)
Limpeza	2700 (500, 4)	2600 (500, 4)	2300 (500, 4)	2700 (500, 4)	2300 (500, 4)	2500 (500, 4)	2700 (500, 4)

## b) Características de desempenho do método

Foram construídas três curvas de calibração para cada metal e foram usados os resultados obtidos para calcular a equação da reta pelo método de regressão dos mínimos-quadrados. Os dados de linearidade dos métodos por GF AAS estão resumidos na Tabela 20, em todos os casos, o ajuste linear foi considerado adequado para o propósito.

A Tabela 20 também mostra a massa característica e o limite de detecção para os analitos. A massa característica,  $m_0$  (pg), foi calculada da inclinação (b) da curva de calibração, usando a equação  $m_0=0,0044 \times 10/b$  para um volume de amostra de 10  $\mu\text{L}$ . E o limite de detecção (LD,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foi calculado pela equação  $\text{LD}=3,3 \times \text{Sa}/b$  onde o Sa era o desvio padrão do intercepto e b a inclinação da curva analítica.

A recuperação (exatidão) foi determinada acrescentando quantidades conhecidas de padrão inorgânico a todas as emulsões de amostra. Os resultados de recuperação são mostrados na Tabela 21 e variaram de 83 a 121%. Considerando as baixas quantias adicionadas (de 10 a 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), os valores encontrados foram considerados apropriados.

TABELA 20 – Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metais em amostras emulsionadas por GF AAS.

Metal	Linearidade <sup>a</sup>			$\mu_0$ (pg)	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
	Faixa <sup>b</sup>	Equação da regressão <sup>b</sup>	$R^2$		
Cr	0 – 20	$A=0,0100+0,02113 C$	0,9964	9	1,1
Pb	0 – 20	$A=0,0038+0,0008 C$	0,9952	117	1,3
Mn	0 – 20	$A=0,0051+0,0076 C$	0,9986	115	0,6
Ni	0 – 40	$A=0,0097+0,0024 C$	0,9993	36	1,0
As	0 – 50	$A=0,0016+0,0046 C$	0,9920	56	4,5
Cd	0 – 40	$A=0,0208+0,1044 C$	0,9695	4	6,6
Cu	0 – 40	$A=0,0069+0,0778 C$	0,9981	13	1,6

<sup>a</sup> Dados obtidos de três curvas de calibração;

<sup>b</sup> A=absorvância; C ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )=concentração do elemento na solução padrão

TABELA 21 – Resultados da recuperação (%  $\pm$ DP, n=3) dos analitos nas amostras adicionadas.

Sample	Cr <sup>a</sup>	Mn <sup>a</sup>	Ni <sup>a</sup>	Pb <sup>b</sup>	As <sup>b</sup>	Cd <sup>b</sup>	Cu <sup>b</sup>
Oleo de arroz	85,5 $\pm$ 3,5	98,5 $\pm$ 7,6	97,5 $\pm$ 5,0	107,3 $\pm$ 2,5	91,2 $\pm$ 1,3	97,3 $\pm$ 4,5	97,8 $\pm$ 0,2
Oleo de canola	90,3 $\pm$ 2,5	110,8 $\pm$ 1,6	107,1 $\pm$ 4,6	101,8 $\pm$ 13,6	95,2 $\pm$ 2,9	102,8 $\pm$ 5,3	98,0 $\pm$ 2,4
Oleo de girasol	84,8 $\pm$ 2,7	100,6 $\pm$ 7,5	120,2 $\pm$ 14,8	91,6 $\pm$ 1,8	88,7 $\pm$ 5,8	99,6 $\pm$ 8,8	110,6 $\pm$ 5,1
Oleo de milho	86,5 $\pm$ 0,5	99,7 $\pm$ 3,1	120,9 $\pm$ 16,4	104,7 $\pm$ 2,0	100,7 $\pm$ 2,8	110,0 $\pm$ 0,6	116,7 $\pm$ 2,4
Oleo de soja	87,9 $\pm$ 1,0	108,8 $\pm$ 3,4	121,5 $\pm$ 3,2	107,5 $\pm$ 2,1	92,6 $\pm$ 2,5	106,9 $\pm$ 1,9	89,7 $\pm$ 1,4
Azeite de oliva	94,9 $\pm$ 2,4	116,4 $\pm$ 4,2	119,3 $\pm$ 5,4	108,3 $\pm$ 9,9	90,8 $\pm$ 7,0	100,0 $\pm$ 2,8	101,0 $\pm$ 2,7
Azeite de oliva	99,6 $\pm$ 2,8	109,6 $\pm$ 1,1	115,5 $\pm$ 1,9	93,4 $\pm$ 5,0	90,7 $\pm$ 5,8	109,7 $\pm$ 4,0	98,2 $\pm$ 3,0
Margarina light	83,2 $\pm$ 3,4	116,8 $\pm$ 11	86,6 $\pm$ 1,9	119,2 $\pm$ 4,3	85,0 $\pm$ 3,0	96,5 $\pm$ 1,7	108,2 $\pm$ 1,8
Margarina	89,5 $\pm$ 0,9	121,5 $\pm$ 5,0	101,1 $\pm$ 12,3	107,6 $\pm$ 4,5	84,6 $\pm$ 0,6	91,7 $\pm$ 1,4	106,5 $\pm$ 1,7
Manteiga	92,8 $\pm$ 0,7	96,7 $\pm$ 3,6	112,6 $\pm$ 10,9	120,7 $\pm$ 4,9	83,5 $\pm$ 2,0	83,3 $\pm$ 3,1	88,5 $\pm$ 4,4

<sup>a</sup>10  $\mu$ g L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>25  $\mu$ g L<sup>-1</sup>

### 5.3.2.2 Aplicação em amostras reais

Amostras reais de óleos, margarinas e manteigas foram analisadas pelo método proposto para a determinação dos metais e os resultados podem ser vistos na Tabela 22. Existem poucos dados na literatura relativo ao conteúdo de metais em óleo comestíveis, margarinas e manteigas, com a exceção de alguns elementos como Cu, Cr, Ni e Pb.

Entre os metais analisados neste estudo, particularmente o Fe, Cu, e Ni são conhecidos por aumentar a taxa de oxidação dos óleos. Os elementos As, Cr, Cd, e Pb podem ser prejudiciais para humanos devido a sua toxicidade e seu papel metabólico (ANTHEMIDIS et al., 2005; MENDIL et al., 2008).

Existe pouca regulamentação para os limites de metais em alimentos. De acordo com estes regulamentos, os conteúdos aprovados para os metais investigados em óleos e gorduras são: 0,1 mg kg<sup>-1</sup> (As e Pb), 1,0 mg kg<sup>-1</sup> (Cd), 5,0 mg kg<sup>-1</sup> (Ni) e 0,1 – 0,4 mg kg<sup>-1</sup> (Cu). De acordo com os regulamentos do governo brasileiro, os valores encontrados para estes metais nas amostras analisadas estavam dentro da concentração máxima permitida (Brazil, 1965; Brazil, 1998).



TABELA 22 – Concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de óleos e gorduras comestíveis, n=3

Amostra	As <sup>a</sup> , Cd <sup>b</sup> , Cr <sup>c</sup>	Mn <sup>d</sup>	Pb	Ni	Cu
Oleo de arroz	<LD	<LD	0,007 ±0,001 <sup>e</sup>	0,03 ±0,01	0,085 ±0,053
Oleo de canola	<LD	<LD	0,004 ±0,002 <sup>e</sup>	0,02 ±0,01	0,044 ±0,002
Oleo de girasol	<LD	<LD	0,010 ±0,003 <sup>e</sup>	0,04 ±0,01	0,003 ±0,0004 <sup>f</sup>
Oleo de milho	<LD	<LD	0,009 ±0,001 <sup>e</sup>	0,04 ±0,02	0,003 ±0,0006 <sup>f</sup>
Oleo de soja	<LD	<LD	0,005 ±0,002 <sup>e</sup>	0,07 ±0,01	0,029 ±0,014
Azeite de oliva	<LD	<LD	0,014 ±0,008 <sup>e</sup>	0,07 ±0,02	0,047 ±0,007
Azeite de oliva	<LD	<LD	0,014 ±0,013 <sup>e</sup>	0,07 ±0,01	0,028 ±0,017
Margarina light	<LD	0,59±0,25	0,03 ±0,012	0,52 ±0,06	0,049 ±0,015
Margarina	<LD	0,34±0,15	0,05 ±0,010	1,70 ±0,32	0,039 ±0,013
Manteiga	<LD	0,02±0,01	0,08 ±0,016	0,59 ±0,12	0,032 ±0,012

<sup>a</sup>LD = 0,06  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; <sup>b</sup>LD = 0,09  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; <sup>c</sup>LD = 0,02  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; <sup>d</sup>LD = 0,01  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; <sup>e</sup> valores abaixo do LD = 0,02  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; valores abaixo do LD = 0,02  $\mu\text{g g}^{-1}$ ;

### **5.3.3 Determinação de alumínio, cobre e manganês em amostras de chocolate micro emulsionadas por GF AAS.**

O chocolate é uma fonte extremamente rica de muitos elementos essenciais, embora possa conter possíveis elementos tóxicos. Entretanto, a predição correta da ingestão destes elementos tóxicos é uma tarefa muito complexa (BORCHERS et al., 2000). Os dados disponíveis sobre o conteúdo de metais nos chocolate são freqüentemente antigos e incompletos e em muitos casos incertos devido à falta de descrição dos procedimentos analíticos (RIBEIRO et al., 2003).

Neste estudo, o propósito foi determinar alguns metais traços (Al, Cu e Mn) em amostras de chocolate por GF AAS, usando emulsificação como procedimento de preparação de amostra e demonstrar a aplicabilidade de método para análise rotineira de chocolate.

#### 5.3.3.1 Desenvolvimento do método

##### a) Determinação das condições analíticas

Na determinação de Mn e Cu, para determinar as condições analíticas foram avaliadas as curvas de pirólise e atomização estabelecidas em estudo anterior. Para Mn optou-se por realizar as determinações sem o uso de modificador químico e para as determinações de Cu foi utilizado modificador químico composto por nitrato de paládio e magnésio.

Para encontrar as melhores condições analíticas para Al foram contruídas curvas de pirólise e atomização com emulsões enriquecidas com padrões aquosos de Al (Figura 14). Foi analisada a influência dos modificadores químicos nitrato de paládio e nitrato de magnésio, sendo que o uso destes não influenciou nas determinações de Al. Foram escolhidas as temperaturas de 1300 °C para pirólise e 2600 °C para atomização do analito.

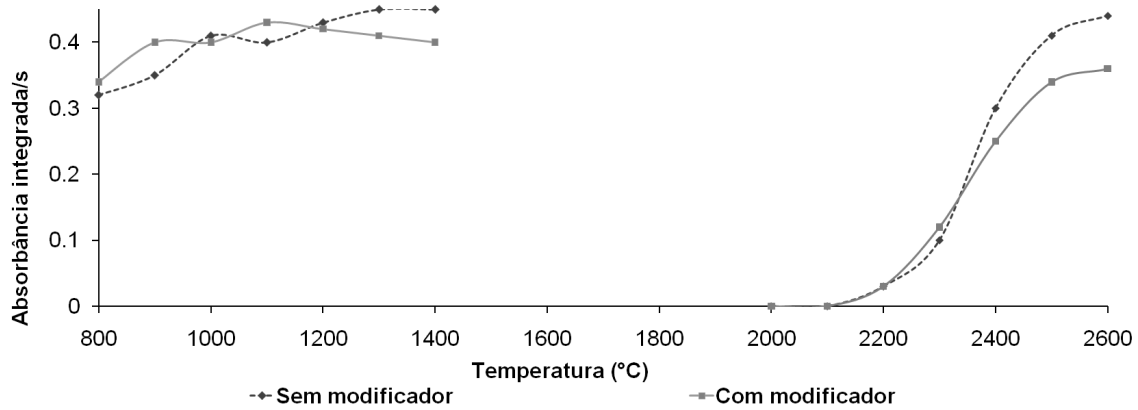


FIGURA 14 - Curvas de pirólise e atomização para Al em emulsão. Temperatura de atomização para curva de pirólise: 2600 °C; temperatura de pirólise para curva de atomização: 1300 °C; volume dos modificadores Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> = 3 µL e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> = 3 µL; Al = 1430 pg.

As condições analíticas para as determinações para Al, Mn e Cu em amostras de chocolate microemulsionadas estão sumarizadas na Tabela 23, onde estão apresentados os modificadores químicos empregados e o programa de temperatura desenvolvido. Três passos garantiram secagem completa dos padrões e amostras emulsionados.

TABELA 23 – Condições analíticas para determinação de metais em amostras de chocolate por GFAAS

	Al	Mn	Cu
Comprimento de onda (nm)	309,3	279,5	324,8
Modificador (µL)	-	-	Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5) Mg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)
Programa de temperatura °C (tempo da rampa (s), tempo de permanência (s))			
Secagem	90 (5, 20)	90 (5, 20)	90 (5, 20)
Secagem	105 (3, 20)	105 (3, 20)	105 (3, 20)
Secagem	110 (2, 10)	110 (2, 10)	120 (2, 10)
Pirólise	1300 (250, 10)	1400 (250, 10)	1000 (250, 10)
Atomização	2600 (1500, 3)	2400 (1500, 4)	2500 (1500, 4)
Limpeza	2700 (250, 4)	2600 (500, 4)	2700 (500, 4)

b) Características de desempenho do método

O método foi validado pela determinação das seguintes características operacionais: linearidade, precisão e limite de detecção. Além disso, a sensibilidade foi determinada pela massa característica ( $m_0$ ).

Foram construídas três curvas de calibração para cada metal e foram usados os resultados obtidos para calcular a equação da reta usando regressão linear pelo método dos mínimos-quadrados. Os dados de linearidade avaliados por análise de variância (ANOVA) demonstraram uma regressão linear adequada e nenhum desvio significativo da linearidade ( $P < 0,05$ ). Os dados da linearidade do método por GF AAS estão resumidos na Tabela 24 e, em todos os casos, o ajuste linear foi

considerado adequado para o propósito. A Tabela 24 também mostra a massa característica e o limite de detecção para os analitos. A massa característica,  $m_0$  (pg), foi calculada da inclinação (b) da curva de calibração, usando a equação  $m_0=0,0044 \times 10/b$  para um volume de amostra de 10  $\mu\text{L}$ . E o limite de detecção (LD,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foi calculado da equação  $\text{LD}=3,3 \times \text{Sa}/b$  onde o Sa era o desvio padrão do intercepto da curva de calibração e b o declive da curva de calibração.

TABELA 24 - Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de metal em amostras emulsionadas.

Metal	Linearidade <sup>a</sup>			ANOVA <sup>a</sup>		$\mu_0$ (pg)	LD <sup>b</sup>
	Faixa <sup>b</sup>	Equação da regressão <sup>c</sup>	$R^2$	Regressão linear <sup>d</sup>	Desvio da linearidade <sup>e</sup>		
Al	0-100	$A=0,0018+0,0071 C$	0,9988	686,91	0,21	49	3,5
Mn	0 – 50	$A=0,0094+0,0229 C$	0,9977	198,66	0,11	9	2,4
Cu	0 – 40	$A=0,0066+0,0560 C$	0,9958	232,06	0,25	13	2,4

<sup>a</sup> Dados obtidos de três curvas de calibração; <sup>b</sup>  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; <sup>c</sup> A=Absorvância e C ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) = concentração do elemento na solução padrão; <sup>d</sup>  $F_{\text{tab}}= 4,75$  ( $p=0,05$ ); <sup>e</sup>  $F_{\text{tab}}= 3,26$  ( $p=0,05$ )

A exatidão do método foi verificada pela análise de materiais de referência certificados. Para Cu e Mn, usou-se o Baking Chocolate SRM 2384 e o Whole Egg Powder RM 8415 foi usado no caso do Al, pois não há valor certificado no Baking Chocolate. Os valores obtidos foram 103%, 98% e 108% para o Al, Cu e Mn, respectivamente. O teste  $t$  de Student foi empregado para comparar os valores obtidos com os valores certificados. Todos os valores de  $t$  calculados foram mais baixos que os valores de  $t$  tabelados ( $P < 0,05$ ), não indicando nenhuma diferença significativa entre as concentrações medidas e as certificadas. A Tabela 25 mostra os resultados da determinação dos metais nos MRCs comparando-os com os valores certificados. Além disso, um ensaio adicional de recuperação foi realizado pela adição de quantidades conhecidas de padrão inorgânico a todas as amostras emulsionadas. Os resultados de recuperação variaram de 88 a 108% e estão

mostrados na Tabela 26. Considerando as baixas quantidades adicionadas (de 25 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), estes valores foram considerados satisfatórios.

TABELA 25 - Determinação dos analitos em materiais de referência certificada.

Elemento	Concentrações $\mu\text{g g}^{-1}$		Recuperação (%)	$t_{\text{exp}}^e$
	Valor certificado <sup>a</sup>	Valor encontrado <sup>d</sup>		
Al	540 $\pm$ 86 <sup>b</sup>	556 $\pm$ 27	103,0 $\pm$ 4,9	0,04
Cu	23,2 $\pm$ 1,2 <sup>c</sup>	22,8 $\pm$ 1,4	98,3 $\pm$ 1,4	0,05
Mn	20,3 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>	22,0 $\pm$ 0,7	108,5 $\pm$ 3,3	0,16

<sup>a</sup> Limite de confiança 95%

<sup>b</sup> Whole Egg Powder (RM 8415)

<sup>c</sup> Baking chocolate (NIST SRM 2384)

<sup>d</sup> Média  $\pm$  desvio padrão

<sup>e</sup>  $t_{\text{tab}} = 2,78$  ( $p$  0,05)

TABELA 26 - Resultados de recuperação (%  $\pm$ DP, n=3) dos analitos nas amostras adicionadas.

Tipo de chocolate	Al <sup>a</sup>	Mn <sup>b</sup>	Cu <sup>b</sup>
Branco	102,5 $\pm$ 13,4	94,3 $\pm$ 5,4	88,1 $\pm$ 1,0
Ao leite	101,4 $\pm$ 7,8	100,2 $\pm$ 8,3	101,4 $\pm$ 5,6
Preto	108,7 $\pm$ 4,1	106,0 $\pm$ 11,5	103,7 $\pm$ 5,1

<sup>a</sup> 50  $\mu\text{g L}^{-1}$

<sup>b</sup> 25  $\mu\text{g L}^{-1}$

### 5.3.3.2 Aplicação em amostras reais

Há poucos dados relativos ao conteúdo de metais em amostras de chocolate na literatura (SEPE et al, 2001; JALBANI et al, 2007; GÜLDAS, 2008). Os resultados obtidos para as amostras de chocolate analisadas estão mostrados na Tabela 27. As concentrações médias de Al, Cu e Mn obtidas para todas as amostras examinadas foi 27,6  $\pm$  18,6 mg  $\text{kg}^{-1}$ , 3,6  $\pm$  3,8 mg  $\text{kg}^{-1}$  e 6,3  $\pm$  4,6 mg  $\text{kg}^{-1}$ , respectivamente. A

ampla dispersão entre os dados é devido aos diferentes conteúdos dos metais entre as amostras de chocolate branco, ao leite e pretos; sendo que para os três elementos, os valores foram diretamente correlacionados ao percentual de cacau. Os valores de Al são mais altos dos achados por SEPE et al. (2001) ( $9,2 \pm 7,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), porém estão próximos aos valores descritos por JALBANI et al. (2007) que encontraram  $69,3 \pm 30,5 \text{ mg kg}^{-1}$  para chocolate baseado em cacau e  $24,3 \pm 5,0 \text{ mg kg}^{-1}$  para chocolate baseado em leite. A média de Cu nas nos chocolates analisados estava próximo dos valores encontrados por Gldas (2008) que variaram de 9,2 a  $10,6 \text{ mg kg}^{-1}$ . Não há dados na literatura consultada para Mn em amostras de chocolate.

TABELA 27 – Níveis de concentração dos elementos ( $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{SD}$ , n=3) em amostras de chocolate.

Tipo de Chocolate	Marca	Teor de cacau %	Al	Mn	Cu
Branco	1	n.i.	20,90 $\pm$ 3,88	2,09 $\pm$ 0,26	0,17 $\pm$ 0,04
	2	n.i.	10,58 $\pm$ 1,20	2,71 $\pm$ 0,23	0,07 $\pm$ 0,03
	3	27	11,05 $\pm$ 0,79	1,73 $\pm$ 0,10	< LD
	4	n.i.	14,09 $\pm$ 1,34	0,83 $\pm$ 0,05	< LD
	5	n.i.	20,96 $\pm$ 3,19	1,31 $\pm$ 0,18	< LD
Ao leite	6	n.i.	22,57 $\pm$ 3,34	4,37 $\pm$ 0,26	2,31 $\pm$ 0,14
	7	n.i.	22,74 $\pm$ 2,96	4,38 $\pm$ 0,26	2,06 $\pm$ 0,30
	8	32	17,14 $\pm$ 2,27	5,19 $\pm$ 0,23	1,84 $\pm$ 0,01
	9	n.i.	19,85 $\pm$ 1,31	3,57 $\pm$ 0,25	1,53 $\pm$ 0,03
	10	n.i.	22,69 $\pm$ 2,38	4,76 $\pm$ 0,19	1,82 $\pm$ 0,18
Preto	11	n.i.	30,17 $\pm$ 1,14	8,10 $\pm$ 0,19	4,42 $\pm$ 0,15
	12	n.i.	32,96 $\pm$ 3,91	10,17 $\pm$ 0,44	7,11 $\pm$ 0,06
	13	43	27,61 $\pm$ 1,42	8,42 $\pm$ 0,21	7,74 $\pm$ 0,27
	14	n.i.	42,30 $\pm$ 2,42	9,74 $\pm$ 1,06	4,26 $\pm$ 0,10
	15	n.i.	27,23 $\pm$ 3,74	8,55 $\pm$ 0,40	5,58 $\pm$ 0,13
	16	50	34,22 $\pm$ 5,06	13,35 $\pm$ 0,97	9,72 $\pm$ 0,66
	17	70	92,14 $\pm$ 4,55	17,33 $\pm$ 0,28	12,38 $\pm$ 0,84

n.i.: não informado

LD: Limite de Detecção

Do ponto de vista toxicológico, podem ser feitas algumas considerações: alumínio é um elemento não-essencial, ao qual os humanos são freqüentemente expostos e esta exposição pode ocorrer via oral por todos os tipos de alimentos. O corpo humano saudável tem barreiras efetivas para reduzir a absorção sistêmica do alumínio ingerido e este pode ser considerado inofensivo. Porém, a exposição ao Al tem sido implicada em várias patologias humanas, incluindo encefalopatia/demência dialítica, doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (FAO/WHO, 1989). O



WHO/FAO - Expert Committee on Food Additives estabeleceu uma ingestão diária tolerável de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal, e que dá uma entrada diária tolerável de 70 mg para um adulto com 70 kg. A quantidade AI resultante do consumo dos chocolates estudados aqui não representa perigo para uma população saudável. Até mesmo em chocolates escuros, onde as quantidades são mais altas, ela representa somente cerca de 3% da ingestão tolerável para um adulto saudável.

Cobre é um elemento essencial para humanos e é amplamente distribuído nos tecidos biológicos. Enzimas de cobre estão envolvidas em uma variedade de reações metabólicas, como na utilização de oxigênio durante respiração celular e na utilização de energia. Entretanto, como para todos os elementos essenciais, quantidades excessivas podem causar problemas sérios de saúde. Sua presença em chocolates é devida aos compostos de cobre utilizados no plantio do cacau como praguicida (SILVA et al., 2006). A Ingestão Diária Recomendada (IDR) para homens e mulheres adultos são  $900 \mu\text{g}/\text{dia}$ . Os chocolates analisados contêm níveis de  $0,07$  a  $12,4 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cu, para chocolate branco e preto, respectivamente. Um chocolate preto com 70% de licor de cacau pode prover 35% da IDR de cobre por porção (25 g) (IOM, 2000).

Manganês é envolvido na formação dos ossos e no metabolismo de aminoácidos, lipídios e carboidratos. Não há dados suficientes para fixar uma Estimativa da Quantidade Requerida (EQR) para o manganês, mas uma Ingestão Adequada (IA) para um adulto é de aproximadamente,  $2,0 \text{ mg}/\text{dia}$  e uma Ingestão Superior Tolerável (IST) de  $11 \text{ mg}/\text{dia}$  pode ser considerada (IOM, 2000). Nas amostras analisadas, as quantidades de Mn variaram de  $0,8$  a  $17,3 \mu\text{g g}^{-1}$  e os níveis mais altos foram nos chocolates pretos. Em uma porção de 25 g de chocolate preto há uma quantidade substancialmente maior de manganês ( $0,4 \text{ mg}$ ) do que no chocolate branco ( $0,02 \text{ mg}$ ). Um chocolate preto pode prover 22% da IA para um adulto saudável (IOM, 2000).

## 5.4 Considerações finais

A análise de alimentos é uma área que está em constante evolução, expansão dada sua importância sobre a saúde humana. O conhecimento do perfil nutricional e toxicológico dos alimentos, bem como, se eles estão respondendo às exigências das leis vigentes, é de suma importância.

Alguns metais, em níveis de concentração adequados, são indispensáveis a diversos processos metabólicos. Entretanto, quando em excesso, estes mesmos metais podem provocar sérios problemas à saúde. Portanto, há uma necessidade de se ter métodos confiáveis de determinação de traços de metais em alimentos.

Além do custo, o desenvolvimento e validação de um método analítico demandam tempo e dedicação. Disponibilizar métodos já validados e com problemas contornados, como a alta concentração lipídica de amostras, é de grande valia para o campo das análises químicas, além de contribuir para a pesquisa acadêmica.

Quanto ao método de análise, a sua escolha é um passo muito importante, pois o alimento é, geralmente, uma amostra muito complexa, em que os vários componentes da matriz podem estar interferindo entre si. Esta escolha depende essencialmente do analito e do produto a ser analisado. A AAS mostrou-se uma técnica robusta e versátil, permitindo realizar todas as análises pretendidas com boa precisão e exatidão.

Sistemas emulsionados têm sido utilizados no preparo de amostras para análises espectrométricas e, frente ao fato da alta fração lipídica presente em alguns alimentos, a aplicação destes sistemas mostrou ser uma alternativa eficaz e com grandes perspectivas para contornar esta questão. Contudo, o grande desafio quando se trata da aplicação de emulsões em análises químicas é que sua estabilidade que deve ser adequada o suficiente para permitir a análise. O modo de preparo é um dos maiores responsáveis por se conseguir uma boa estabilidade. Sabe-se que é muito raro obter uma emulsão de maneira espontânea, ao contrário disso, deve ser fornecida energia ao sistema na forma de calor e agitação. Além disso, reagentes como ácido nítrico, que é comumente usado para a destruição da matriz orgânica no preparo de amostras para análises de metais, pode agir sobre a estrutura micelar formada pelos tensoativos, desestruturando-as.

Analisando trabalhos publicados que aplicam sistemas emulsionados para o preparo de amostras para determinações espectrométricas percebe-se que a maioria faz uso de ácido nítrico na decomposição da amostras e a aplicação de calor ao sistema é rara. Estes fatos, aliados a, por exemplo, a escolha inadequada do tensoativo pode levar a sistemas com baixa estabilidade.

As emulsões consistem de sistemas inerentemente instáveis (AULTON, 2005) e alcançar a estabilidade de um sistema formado por duas fases imiscíveis demanda certa habilidade e experiência do formulador. Neste trabalho este objetivo foi perfeitamente alcançado as emulsões finais apresentaram-se como um líquido branco leitoso com aspecto homogêneo, com baixa viscosidade, longa estabilidade e não ocorreu coalescência.

Diferentemente das emulsões, as microemulsões podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, ópticamente transparentes, de baixa viscosidade e formando um sistema micro-heterogêneo, apesar de visualmente homogêneo. As microemulsões de margarina e de chocolate mostraram-se aparentemente como uma “solução” límpida e homogênea sem apresentar gotículas de óleo suspensa.

Para finalizar podemos estabelecer que para determinar as condições ideais para a aplicação de sistemas emulsionados devem ser reunidas informações fundamentalmente do tipo de amostra, da quantidade de amostra a ser emulsionada, do tipo do tensoativo escolhido e da quantidade do tensoativo.

O emprego de sistemas organizados por tensoativos como emulsões e microemulsões no preparo de amostra mostrou-se uma alternativa promissora e versátil, mostrando-se capaz de ser aplicada nas mais diversas amostras e para medir diversos elementos por AAS. Todavia, sua aplicação requer conhecimento a cerca do comportamento destes sistemas.

## 6 CONCLUSÕES

---

Emulsões de amostras com elevado teor lipídico contendo apenas tensoativo e água foram satisfatoriamente preparadas para a determinação de metais essenciais e não essenciais em diversas matrizes. As emulsões se mostraram estáveis por longos períodos de tempo. Com exceção das medidas de Se em ovos por GF AAS em que o padrão foi preparado na própria emulsão, para todos os outros sistemas, as emulsões permitiram o uso de padrões aquosos para calibração, além de determinações por AAS livres de interferências, com as condições otimizadas.

## 7 REFERÊNCIAS

---

AFOAKWA, E.O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate e a review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 18, p. 290-298, 2007.

ALLEN, L.; SIITONEN, P.; THOMPSON, H. Determination of copper, lead, and nickel in edible oils by plasma and furnace atomic spectroscopies. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 75, p. 477-481, 1998.

ANSARI, R.; KAZI, T.G.; JAMALI, M.K.; ARAIN, M.B.; WAGAN, M.D.; JALBANI, N.; AFRIDI, H.I.; SHAH, A.Q. Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. **Food Chemistry**. v. 115, p. 318-323, 2009.

ANTHEMIDIS, A.N.; ARVANITIDIS, V.; STRATIS, J.A. On-line emulsion formation and multi-element analysis of edible oils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 537, p. 271–278, 2005.

AUCELIO, R.Q.; CURTIUS, A.J. Evaluation of electrothermal atomic absorption spectrometry for trace determination of Sb, As and Se in gasoline and kerosene using microemulsion sample introduction and two approaches for chemical modification. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 17, p. 242–247, 2002.

AUCELIO, R.Q.; CURTIUS, A.J.; WELZ B. Sequential determination of Sb and Sn in used lubricating oil by electrothermal atomic absorption spectrometry using Ru as a permanent modifier and microemulsion sample introduction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v.15, 1389-1393, 2000.

AUCELIO, R.Q.; DOYLE, A.; PIZZORNO, B.S.; TRISTÃO, M.L.B.; CAMPOS, R.C. Electrothermal atomic absorption spectrometric method for the determination of vanadium in diesel and asphaltene prepared as detergentless microemulsions. **Microchemical Journal**. v. 78, p. 21– 26, 2004.

AULTON, M. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Tradução George G. Ortega et al. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

B. WELZ, G. SCHLEMMER, J. R. MUDAKAVI. Palladium nitrate – magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5. Performance for the determination of 21 elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 7, 1257-1271, 1992.

BARALKIEWICZ, D.; EL SAYED, U.; FILIPIAK, M.; GRAMOWSKA, H.; MLECZEK, M. Determination of selenium in infant foods using electrothermal atomic absorption spectrometry with direct slurry sample introduction. **Central European Journal of Chemistry**. v. 2, p. 334–346, 2004.

BARGELLINI, A.; MARCHESIA, I.; RIZZI, L.; CAUTERUCCIO, L.; MASIRONI, R.; SIMIOLI, M.; BORELLA, P. Selenium interactions with essential and toxic elements

in egg yolk from commercial and fortified eggs. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 22, p. 234-241, 2008.

BENINCASA, C.; LEWIS, J.; PERRI, E.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. **Analytica Chimica Acta**. v. 585, p. 366–370, 2007.

BEZERRA, M.A.; FERREIRA, S.L.C. Extração em ponto de nuvem: princípios e aplicações em química analítica. Ed. Edições UESB: Vitória da Conquista, 2006.

BOHRER, D.; BECKER, E.; DO NASCIMENTO, P.C.; DESSUY, M.; DE CARVALHO, L.M. Comparison of graphite furnace and hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of selenium status in chicken meat. **Food Chemistry**. v. 104, p. 868–875, 2007.

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.; HANNUM, S.M.; GERSHWIN, M.E. Cocoa and Chocolate: Composition, Bioavailability, and Health Implications. **Journal of Medicinal Food**. v. 3, p. 77-103, 2000.

BRAZIL. Decreto nº 55.871 de 1965. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos.

BRAZIL. Portaria nº 685 de 1998. Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Spatial and temporal patterns in metal levels in eggs of common terns (*Sterna hirundo*) in New Jersey. **Science of the Total Environment**. v. 311, p. 91–100, 2003.

BURGUERA, J. L.; AVILA-GOMEZ, R.M.; BURGUERA, M.; DE SALAGER, R.A.; SALAGER, J.L.; BRACHO, C.L.; BURGUERA-PASCU, M.; BURGUERA-PASCU, C.; BRUNETTO, R.; GALLIGNANI, M.; DE PENA, Y.P. Optimum phase-behavior formulation of surfactant/oil/water systems for the determination of chromium in heavy crude oil and in bitumen-in-water emulsion. **Talanta**. v. 61, p. 353-361, 2003.

BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; ANTON, R.E.; SALAGER, J.L.; ARANDIA, M.A.; RONDON, C.; CARRERO, P.; DE PENA, Y.P.; BRUNETTO, R.; GALLIGNANI, M.; Determination of aluminum by electrothermal atomic absorption spectroscopy in lubricating oils emulsified in a sequential injection analysis system. **Talanta**. v. 68, p. 179–186, 2005.

CARASEK, E. Pré-concentração de chumbo e cádmio em um sistema de micro extração líquido-líquido e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 25, p. 748-752, 2002.

CARBONELL, V.; MAURI, A.R.; SALVADOR, A.; DE LA GUARDIA, M. Direct Determination of Copper and Iron in Edible Oils Using Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**. v. 6, p. 581-584, 1991.

CASTILLO, J.R.; JIMENEZ, M.S.; EBDON, L. Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 14, p. 1515–1518, 1999.

CINDRIC, I.J.; ZEINER, M.; STEFFAN, I. Trace elemental characterization of edible oils by ICP–AES and GFAAS. **Microchemical Journal**. v. 85, p. 136–139, 2007.

DA SILVA, E.G.P.; SANTOS, A.C.N.; COSTA, A.C.S.; FORTUNATO, D.M.N.; JOSÉ, N.M.; KORN, M.G.A.; DOS SANTOS, W.N.L.; FERREIRA, S.L.C. Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**. v. 82, p. 159–162, 2006.

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**. v. 18, p. 517–522, 2005.

DALEN, G.V. Determination of Cadmium in Edible Oils and Fats by Direct Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 11, p. 1087-1092, 1996.

DE JESUS A.; SILVA, M.M.; VALE M.G.R. The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 74, p. 1378–1384, 2008.

DE SOUZA, R.M.; MATHIAS, B.M.; DA SILVEIRA, C.L.P.; AUCELIO, R.Q. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry for trace multi-element determination in vegetable oils, margarine and butter after stabilization with propan-1-ol and water. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 60, p. 711 – 715, 2005.

DEMIREL, S.; TUZEN, M.; SARACOGLU, S.; SOYLAK, M. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. **Journal of Hazardous Materials**. v. 152, p. 1020–1026, 2008.

DOS SANTOS, D.S.S.; TEIXEIRA, A.P.; BARBOSA, J.T.P.; FERREIRA, S.L.C.; KORN, M.G.A.; TEIXEIRA, L.S.G. Use of cetyltrimethylammonium bromide as surfactant for the determination of copper and chromium in gasoline emulsions by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 62, p. 1072–1077, 2007.

DOS 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**. v. 382, p. 1099–1102, 2005.

ENGELS, T.; FÖRSTER, T.; RYBINSKI, W.V. The influence of co-emulsifier type on the stability of oil-in-water emulsions. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 99, p. 141-149, 1995.

FERNANDES, K.G.; DE MORAES M.; NETO, J.A.G.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA P.V. Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**. v.26, p. 249-252, 2003.

GARCÍA, E.M.; LORENZO, M.L.; CABRERA, C.; LÓPEZ M.C.; SÁNCHEZ, J. Trace element determination in different milk slurries. **Journal of Dairy Research**. v. 66, p. 569-578, 1999.

GOLUBKINA, N.A.; PAPAZYAN, T.T. Selenium distribution in eggs of avian species, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 145, p. 384–388, 2006.

GÜLDAŞ, M. Comparison of digestion methods and trace elements determination in chocolates with pistachio using atomic absorption spectrometry. **Journal of Food Nutrition Research**. v. 47, p. 92-99, 2008.

HARRIS, D.C. **Química Analítica quantitativa**. 5ª Ed, Rio de Janeiro: LTC, 2001.

HUANG, S.J.; JIANG, S.J. Determination of Zn, Cd and Pb in vegetable oil by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 16, 664–668, 2001.

HUANG, X.; KAKUDA, Y.; CUI, W. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. **Food Hydrocolloids**. v. 15, p. 533-542, 2001.

IOM (Institute of Medicine) - National Academy of Sciences on Dietary Reference Intakes (DRIs) for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate, 2004.

IOM (Institute of Medicine) - National Academy of Sciences on DRIs for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997.

IOM (Institute of Medicine) - National Academy of Sciences on DRIs for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2000.

JALBANI, N.; KAZI, T.G.; JAMALI, M.K.; ARAIN, M.B.; AFRIDI, H.I.; SHEERAZI S.T.; ANSARI, R. Application of fractional design and Doehlert Matrix in the optimization of Experimental Variables Associated with the Ultrasonic-Assisted Digestion of Chocolate Samples for Aluminum Determination by Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of AOAC International**. v. 90, p. 1682-1688, 2007.

JIAKUI, L.; XIAOLONG, W. Effect of dietary organic versus inorganic selenium in laying hens on the productivity, selenium distribution in egg and selenium content in blood, liver and kidney. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 18, p. 65–68, 2004.

JIMENEZ, M.S.; VELARTE, R.; CASTILLO, J.R. On-line emulsions of olive oil samples and ICP-MS multi-elemental determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 18, p. 1154–1162, 2003.



KHALEDI, M.G. Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. **Journal of Chromatography A**. v. 780, p. 3-40, 1997.

KILIÇ, Z.; ACAR, O.; ULASAN, M.; ILIM, M. Determination of lead, copper, zinc, magnesium, calcium and iron in fresh eggs by atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**. v. 76, p. 107–116, 2002.

KIOSSEOGLU, V. Egg yolk protein gels and emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 8, p. 365–370, 2003.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. v. II, Editora Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001.

LAJUNEN, L.H.J. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**. UK: The Royal Society of Chemistry, 1992.

LE MOS, V.A.; SANTOS, M.S.; DAVID, G.T.; MACIEL, M.V.; BEZERRA, M.A. Development of a cloud point extraction method for copper and nickel determination in food samples. **Journal of Hazardous Materials**.

MAGALHÃES, C.E.C.; ARRUDA, M.A.Z. Amostragem de suspensões: Emprego da técnica na análise direta de amostras. *Química Nova*. v.21, p. 459-466, 1998.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**. v. 24, p. 87-93, 2001.

MANJUSHA, R.; DASH, K.; KARUNASAGAR, D. UV-photolysis assisted digestion of food samples for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**. v. 105, p. 260–265, 2007.

MARANHÃO, T.A.; MARTENDAL, E.; BORGES, D.L.G.; CARASEK, E.; WELZ, B.; CURTIUS, A.J. Cloud point extraction for the determination of lead and cadmium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry with multivariate optimization using Box–Behnken design. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 62, p. 1019–1027, 2007.

MENDIL, D.; ULUÖZLÜ, Ö.D.; TÜZEN, M.; SOYLAK, M. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**. v. 154, p. 724-728, 2009.

MENDONÇA, C.R.B. **Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos**. Tese de doutorado em Química. UFRGS, 2005.

MINE, Y. Emulsifying characterization of hens egg yolk proteins in oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**. v. 12, p. 409-415, 1998.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C.P.; HAMID, N.S.A.; YUSOF, S.; CHERN, B.H. Characterization of the influence of main emulsion components on the

physicochemical properties of orange beverage emulsion using response surface methodology. **Food Hydrocolloids**. v. 23, 271-280, 2009.

MURILLO, M.; BENZO, Z.; MARCANO, E.; GOMEZ, C.; GARABOTO A.; MARIN, C. Determination of copper, iron and nickel in edible oils using emulsified solutions by ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 14, p. 815–820, 1999.

NASCENTES, C.C.; ARRUDA. M.A.Z. Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration. **Talanta**. v. 61, p. 759- 768, 2003.

PAN, C.; HUANG, K.; ZHAO, Y.; QIN, S.; CHEN, F.; HU, Q. Effect of selenium source and level in hen's diet on tissue selenium deposition and egg selenium concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 1027-1032, 2007.

PAPPAS, A.C.; KARADAS, F.; SURAI, P.F.; WOOD, N.A.R.; CASSEY, P.; BORTOLOTTI, G.R.; SPEAKE, B.K. Interspecies variation in yolk selenium concentrations among eggs of free-living birds: The effect of phylogeny. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 20, p. 155–160, 2006.

PLANELLS, E.; RIVERO, M.; CARBONELL, J.; MATAIX, J.; LLOPIS, J. Ability of a Cocoa Product to Prevent Chronic Mg Deficiency in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p. 4017–4022, 1997.

PRISTA, N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.; LOBO, J.S. **Tecnologia Farmacêutica**. v. 1, 6ª ed., Ed. Fundação Calouste Guebenkian, Lisboa, 2003.

REYES, M. N. M. AND CAMPOS, R. C. Determination of copper and nickel in vegetable oils by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 70, p. 929-932, 2006.

RIBEIRO, P.; DE MORAIS, T.B.; COLUGNATI F.A.B; SIGULEM, D.M. Tabelas de composição química de alimentos: análise comparativa com resultados laboratoriais. **Revista de Saúde Pública**. v. 37, p. 216-225, 2003.

SAITOH, T.; HINZET, W.L.. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity Ligands for the extraction of hydrophilic Proteins. **Talanta**. v. 42, p. 119-127, 1995.

SANTELLI, R.E.; BEZERRA, M.A.; FREIRE, A.S.; OLIVEIRA, E.P.; DE CARVALHO, M.F.B. Non-volatile vanadium determination in petroleum condensate, diesel and gasoline prepared as detergent emulsions using GF AAS. **Fuel**. v. 87, p. 1617–1622, 2008.

SANZ-MEDEL, A.; DE LA CAMPA, M.R.F.; GONZALEZ, E.B.; FERNANDEZ-SANCHEZ M.L. Organised surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 54, p. 251-287, 1999.

SANZ-MEDEL, A.; DE LA CAMPA, M.R.F.; VALDEZ-HEVIA Y TEMPRANO, M.C.; FERNANDEZ, B.A.; LIU, Y.M. Surfactant-based ordered media in analytical atomic spectrometry. **Talanta**. v. 40, p. 1759-1768, 1993.

SEPE, A.; COSTANTINI, S.; CIARALLI, L.; CIPROTTI M.; GIORDANO, R. Evaluation of aluminium concentrations in samples of chocolate and beverages by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Additives & Contaminants**. v. 18, p. 788-796, 2001.

SHANG, S.; HONG, W. Flame atomic absorption spectrometric determination of copper, zinc, calcium, magnesium and iron in fresh eggs using micro volume injection. **Talanta**. v. 44, p. 269-274, 1997.

SINKO, P.J. **Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**, 5ª ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, 2008.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5ª ed., Saunders College: New York, 1998.

SLAVIN, W.; MANNING, D.C.; CARNRICK, G.R. Quality-assurance procedures for graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. **Talanta**. v.36, p. 171-178, 1989.

STEINBERG, F.M.; BEARDEN M.M.; KEEN, C.L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**.

SUN, H.J. A rapid method for the determination of trace Cu and Fe in edible salad oil by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 66, p. 549-552, 1989.

SUSSULINI, A.; ARRUDA, M. A. Z. Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem. **Eclética Química**. v. 31, p. 73-80, 2006

**The United States Pharmacopoeia (USP) 31<sup>th</sup> Rev.** (2007) Rockville, United States Pharmacopoeial Convention.

THOMPSON, J. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Tradução Airton Monza da Silveira et al. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TUZEN, M.; SOYLAK, M. Evaluation of trace element contents in canned foods marketed from Turkey. **Food Chemistry**. v. 102, p. 1089–1095, 2007.

ULUOZLU, O.D.; TUZEN, M.; MENDIL, D.; SOYLAK, M. Assessment of trace element contents of chicken products from turkey. **Journal of Hazardous Materials**. v. 163, p. 982–987, 2009.

VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using

electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**. v. 412, p. 121–130, 2000.

WELZ, B; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry** 3<sup>a</sup> ed. Germany; Willey-VCH, 1999.

World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. **Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition**, 2<sup>nd</sup> ed., WHO Library, 2004.

ZEINER, M.; STEFFAN, I.; CINDRIC I.J. Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: A pilot study on the geographical characterization. **Microchemical Journal**. v. 81, p. 171-176,2005.

## 8 ANEXOS

---

**Artigo 1**

**SURFACTANT/OIL/WATER SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF  
SELENIUM IN EGGS BY GRAPHITE FURNACE ATOMIC  
ABSORPTION SPECTROMETRY**

C.V.S. Ieggli, D. Bohrer, S. NoreMBERG, P.C. do Nascimento, L.M. de Carvalho, S.L.  
Vieira, R.N. Reis

Spectrochimica Acta Parte B 64 (2009) 605-609



## Analytical note

Surfactant/oil/water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry<sup>☆</sup>C.V.S. Ieggli<sup>a</sup>, D. Bohrer<sup>a,\*</sup>, S. NoreMBERG<sup>a</sup>, P.C. do Nascimento<sup>a</sup>, L.M. de Carvalho<sup>a</sup>, S.L. Vieira<sup>b</sup>, R.N. Reis<sup>b</sup><sup>a</sup> Departamento de Química, Avenida Roraima, 1000, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97110-970, Santa Maria, RS, Brazil<sup>b</sup> Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 90540-000, Porto Alegre, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 November 2008

Accepted 7 May 2009

Available online 18 May 2009

## Keywords:

Selenium

Emulsion

Egg

Electrothermal atomic absorption spectrometry

## ABSTRACT

An oil-in-water formulation has been optimized to determine trace levels of selenium in whole hen eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry. This method is simpler and requires fewer reagents when compared with other sample pre-treatment procedures. Graphite furnace atomic absorption spectrometric (GF AAS) measurement was carried out using standard addition calibration and Pd as a modifier. The precision, expressed as relative standard deviation, was better than 5% and the limit of detection was  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . The validation of the method was performed against a standard reference material Whole Egg Powder (RM 8415), and the measured Se corresponded to 95.2% of the certified value. The method was used for the determination of the Se level in eggs from hens treated with Se dietary supplements. Inorganic and organic Se sources were added to hen feed. The Se content of eggs was higher when hens were fed with organic Se compared to the other treatments. The proposed method, including sample emulsification for subsequent Se determination by GFAAS has proved to be sensitive, reproducible, simple and economical.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element for animals and humans. It has been implicated with the protection of body tissues against oxidative stress, maintenance of defense against infection, and modulation of growth and development. Chronic Se deficiency may enhance susceptibility to viral infection, cancer, cardiovascular disease, thyroid dysfunction and various inflammatory conditions. However, in spite of its important action, excessive intake can cause harmful effects in the organism [1].

Food is the main source of selenium, and the content of this element is related with the food origin and processing. There is a widespread use of selenium supplementation by enriching commercial foodstuffs for farmed animals with sodium selenite or selenium-enriched yeast [2]. Eggs are of great importance as they provide a significant amount of biologically available forms of Se due to their high nutritional value and capacity to provide 50% of the daily required Se intake in humans [3]. In addition, Se-enriched eggs have been designed and introduced in various markets and are becoming popular [4].

Owing to the essentiality/toxicity dichotomy of selenium, there are numerous procedures for its determination in biological samples and, especially, in foods [5]. It is often determined by graphite furnace

atomic absorption spectrometry (GF AAS) or hydride generation absorption spectrometry (HG AAS) [6]. The choice depends on the matrix composition and selenium species present in the sample [7]. While the HG AAS response is strongly dependent on the selenium form, GF AAS is adequate for the measurement of both organic and inorganic species.

Methods for determining trace elements should involve minimal sample handling; however, literature for selenium determination in eggs reports methods of sample treatment involving digestion with acids and peroxides [8,9], and some have attempted to improve sample digestion by combining the use of these reagents with ultraviolet [10] or microwave radiation [2,11]. This results in additional steps, which may lead to inconveniences such as sampling errors, contamination and losses during handling [3]. In addition, acids might interfere in HG AAS and GF AAS measurements and, therefore, inaccurate results for the determination of selenium can be attributed to the resistance of selenium compounds to oxidation and the volatility of selenium species present or formed [6].

The egg is a system emulsified naturally by components such as phospholipids, lipoproteins and proteins [12,13]; however due to high viscosity and high content of organic matter its direct introduction in the furnace for GF AAS measurement is particularly difficult. Direct emulsification with surfactants provides a rapid procedure for sample preparation since this approach does not require any destruction of the organic matrix [14]. It simply reduces the viscosity and the organic content of the sample, maintaining its homogeneity and stability, making the properties of the egg emulsion appropriate to being analyzed by GF AAS.

<sup>☆</sup> This paper was presented at the 10th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, held in Salvador-Bahia, Brazil, 7–12 September 2008, and is published in the special issue of Spectrochimica Acta Part B, dedicated to that conference.

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 55 3220 8870.

E-mail address: [ndenise@quimica.ufsm.br](mailto:ndenise@quimica.ufsm.br) (D. Bohrer).

## **ANEXO 2**

---

### **Artigo 2**

#### **DETERMINATION OF SODIUM, POTASSIUM, CALCIUM, MAGNESIUM, ZINC AND IRON IN EMULSIFIED EGG SAMPLES BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

**C.V.S. Ieggli, D. Bohrer<sup>\*</sup>, P.C. do Nascimento, L.M. de Carvalho, S.C. Garcia**

Talanta 80 (2010) 1282–1286





## Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in emulsified egg samples by flame atomic absorption spectrometry

C.V.S. Ieggli<sup>a</sup>, D. Bohrer<sup>a,\*</sup>, P.C. do Nascimento<sup>a</sup>, L.M. de Carvalho<sup>a</sup>, S.C. Garcia<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Avenida Roraima 1000, Universidade Federal de Santa Maria, 97110-970 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Toxicology Laboratory, Av. Ipiranga 2752, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 June 2009

Received in revised form

11 September 2009

Accepted 13 September 2009

Available online 22 September 2009

#### Keywords:

Emulsion

Egg

Metal

Flame atomic absorption spectrometry

### ABSTRACT

In this study, oil-in-water formulations were optimized to determine sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in emulsified egg samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). This method is simpler and requires fewer reagents when compared with other sample pre-treatment procedures and allows the calibration to be carried out using aqueous standards. Different oily phases such as corn oil, decyl oleate and octyl stearate were tested, as well as Tween 80, Triton X-100 and Triton 114 were analyzed as surfactants. The optimum type and proportion of formulations were determined and their use depended on the element studied. The emulsion preparation was performed by a conventional method that involves mixing both phases at 60 °C by magnetic stirring and phase inversion to change the water-to-oil ratio by increasing the volume of the surfactant-water external phase and correspondingly decreasing the volume of internal phase. The accuracy of the method was further confirmed by determining the metals in a whole egg powder CRM and recoveries ranged from 97.5% for Mg to 102.2% for Na, with relative standard deviations lower than 2.3%. The precision of the procedures was determined through repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day). The repeatability presented RSD values lower than 4.2%. The intermediate precision was evaluated using the RSD and *F*-test. The RSD values to intermediate precision was lower than 5.3% and the computed *F*-values were lower than tabulated *F*-values, indicating no significant difference between the results obtained on different days. The proposed method including, sample emulsification for subsequent metal determination for FAAS, has proved to be sensitive, reproducible, simple and economical.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Knowledge of the mineral composition of hen eggs is increasingly required for different purposes; these include the estimation of accumulation of toxic species from the hen egg and the role of egg composition in human nutrition [1].

The egg is a system naturally emulsified by components such as phospholipids, lipoproteins and proteins [2]. Eggs are included in several food products exercising various functions. As emulsifier (e.g. mayonnaise) it forms a strong and cohesive film around oil droplets which stabilizes them against coalescence and interacts to form network structures which gives viscoelasticity to products, with unique sensory and textural characteristics [3].

The quality of food products has received great attention due to its influence on human nutrition and health. In this context, the determination of trace metals in foods has become an important field in food analysis [4–6]. However, the accurate determination of

trace metals in hen eggs is still an analytical challenge, due to their low concentration level and the difficulties that arise from matrix characteristics. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) is a powerful detection technique for determining trace elements. The advantages of FAAS include well-known interferences, low operator skill required for operation, and comparatively low cost of instrumentation and maintenance [7]. One disadvantage, however, is the sample pre-treatment which is a necessary step for determining trace elements in complex matrices such as egg. Due to its high viscosity and content of organic matter, direct egg analysis is particularly difficult.

Methods for egg sample treatment involving digestion with acids and peroxides reported in the literature [1,8,9], have attempted to improve digestion by combining the use of these reagents with ultraviolet [10] or microwave radiation [2,11–13]. All these procedures result in additional steps, which may lead to inconveniences such as sampling errors, contamination and losses during handling [10].

Direct emulsification with surfactants provides a rapid procedure for sample preparation since this approach does not require any destruction of the organic matrix [14]. It simply reduces the

\* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8870.

E-mail address: [ndenise@quimica.ufsm.br](mailto:ndenise@quimica.ufsm.br) (D. Bohrer).

## **ANEXO 3**

---

### **Artigo 3**

#### **DETERMINATION OF SODIUM, POTASSIUM, CALCIUM, MAGNESIUM, ZINC AND IRON IN EMULSIFIED CHOCOLATE SAMPLES BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

**C.V.S. Ieggli, D. Bohrer, P.C. do Nascimento, L.M. de Carvalho**

Food Chemistry (*In press*)



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Analytical Methods

## Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron in emulsified chocolate samples by flame atomic absorption spectrometry

C.V.S. Ieggli, D. Bohrer\*, P.C. do Nascimento, L.M. de Carvalho

Departamento de Química, Avenida Roraima, 1000, Universidade Federal de Santa Maria, 97110-970 Santa Maria, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 January 2010

Received in revised form 14 July 2010

Accepted 18 July 2010

Available online xxxx

## Keywords:

Emulsion

Chocolate

Flame atomic absorption spectrometry

## ABSTRACT

In this study, oil-in-water formulations were optimized to determine sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in emulsified chocolate samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). This method is simpler and requires fewer reagents when compared with other sample pre-treatment procedures and allows the calibration to be carried out using aqueous standards. Octyl stearate was used as oily phase. Tween 80 and Triton X100 were tested as surfactants. The optimum type and proportion of formulations were determined and their choice depended on the element studied. The emulsion preparation was performed by a conventional method that involves mixing both phases at  $75 \pm 5^\circ\text{C}$  by magnetic stirring and phase inversion to change the water-to-oil ratio by increasing the volume of the surfactant-water external phase and correspondingly decreasing the volume of internal phase. The validation of the method was performed against a baking chocolate standard reference material (SRM 2384) and recoveries ranged from 88.6% for K to 105.5% for Zn. The proposed method allowed the evaluation of the essential metal status of chocolate with minimum sample manipulation and was reproducible and economical.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

## 1. Introduction

Chocolate is a product obtained from *Theobroma cacao* beans. In order to process cacao beans into chocolate or cocoa, they are left to ferment, dried, roasted and, finally, tritured until they are transformed into a liqueur. Primary chocolate categories are dark, milk and white. The first is made by mixing cocoa liqueur, cocoa butter, sugar and vanilla. The second uses the same process, with the increment of milk, and the white does not include the cocoa liqueur, only the cocoa butter, milk and sugar (Afoakwa, Paterson, & Fowler, 2007).

Chocolate is consumed all over the world, in all segments of society and by people of all ages. Nowadays, the consumer is more and more concerned with the nutritional status of foodstuff and, considering that chocolate is an extremely rich source of many essential minerals, it can contribute to a healthy diet. Nevertheless, the evaluation of nutrient ingestion is a very complex task (Borchers, Keen, Hannum, & Gershwin, 2000). The available nutritional data are frequently old and incomplete and in many cases unreliable due to lack of description of the analytical procedures (Ribeiro, de Moraes, Colugnati, & Sigulem, 2003).

The determination of metals in foods has become an important field in food analysis (Reyes & Campos, 2006). However, the accu-

rate determination of metals in chocolate is still an analytical challenge, due to difficulties arising from matrix characteristics. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) is a powerful detection technique for determining elements in the ppm range. The advantages of FAAS include well-characterized interferences, low operator skill required for operation, and comparatively low cost of instrumentation and maintenance (Welz & Sperling, 1999). However, direct chocolate analysis by FAAS is not possible and the determination of metals in this type of matrix necessarily involves sample digestion, considering that it contains a high content of organic compounds.

The literature reports methods for chocolate sample treatment involving microwave digestion, wet digestion, and dry ashing (Dahiya, Karpe, Hegde, & Sharma, 2005; Güldaş, 2008; Jalbani et al., 2007; Sepe, Costantini, Ciaralli, Ciprotti, & Giordano, 2001). Acids and peroxides are usually added to improve sample decomposition. All these procedures result in additional steps, which may lead to inconveniences such as contamination and losses during handling (Viñas, Pardo-Martínez, & Hernández-Córdoba, 2000).

Direct emulsification with surfactants provides a rapid procedure for sample preparation since this approach does not require any destruction of the organic matrix (Sanz-Medel, de la Campa, Gonzalez, & Fernandez-Sanchez, 1999). It simply reduces the viscosity and the organic content of the sample, making the properties of the chocolate sample close to those capable of being analyzed by FAAS, while maintaining the system's homogeneity

\* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8870.  
E-mail address: [ndenise@quimica.ufsm.br](mailto:ndenise@quimica.ufsm.br) (D. Bohrer).

## **ANEXO 4**

---

### **Manuscrito 1**

#### **FLAME AND GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY FOR TRACE ELEMENT DETERMINATION IN VEGETABLE OILS, MARGARINE AND BUTTER AFTER SAMPLE EMULSIFICATION**

**C.V.S. Ieggli, D. Bohrer, P.C. do Nascimento, L.M. de Carvalho**

Submetido à Food Additives and Contaminants

## Food Additives and Contaminants



### Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable oils, margarine and butter after sample emulsification

Journal:	<i>Food Additives and Contaminants</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Iegqli, Carine; Universidade Federal de Santa Maria, Chemistry; Universidade de Cruz Alta, Pharmacy Bohrer, Denise; Universidade Federal de Santa Maria, Chemistry de Carvalho, Leandro; Universidade Federal de Santa Maria, Chemistry do Nascimento, Paulo Cicero; Universidade Federal de Santa Maria, Chemistry
Methods/Techniques:	GFAAS, FAAS, Metals analysis - AAS, Quality assurance
Additives/Contaminants:	Nutrition, Process contaminants, Trace elements (nutritional), Trace elements (toxic)
Food Types:	Oils and fats, Olive oil, Processed foods

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## **ANEXO 5**

---

### **Manuscrito 2**

#### **DETERMINATION OF ALUMINUM, COPPER AND MANGANESE IN MICRO EMULSIFIED CHOCOLATE SAMPLES BY FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

**C.V.S. Ieggli, D. Bohrer, P.C. do Nascimento, L.M. de Carvalho**

Submetido ao Journal of Food Composition and Analysis

## **ANEXO 6**

---

### **EL SISTEMA SURFACTANTE-ACEITE-ÁGUA EN LA DETERMINACION DE SELENIO EM HUEVOS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON HORNO DE GRAFITO**

**C.V.S. Iegli, S.M.S. NoreMBERG, D. Bohrer, P.C. do Nascimento, L.M. de  
Carvalho**

Labciência (2009) volume I, pg. 6-8

## El sistema surfactante-aceite-agua en la determinación de selenio en huevos por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito

Surfactant-oil-water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry

C.V.S. Ieggli, D. Bohrer, S.M.S. Noremberg, P.C. do Nascimento and L.M. de Carvalho

In this study, it was developed a method for Se determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry in whole hen eggs without any digestion procedure, but preparing an emulsified system containing non-ionic surfactant, egg sample, oil and water. Several experiments were conducted to determine the minimum quantity of surfactant required to form a stable emulsion, as well as different proportions of oils were tested. The best results were obtained with 2.0 % (w/v) Tween 80, 2.0 % (w/v) corn oil and 2.0 % (w/v) egg sample in water. The emulsion preparation was performed following a classical way, which consisted in mixing both phases at 60 °C by the magnetic stirring (3000 rpm) during 15 minutes at room temperature (22 °C). GF AAS measurement was carried out by using standard addition calibration and Pd as a modifier. The precision, expressed as relative standard deviation, was lower than 5 % and the limit of detection was 1.02 µg/L. The validation of the method was performed against a standard reference material Whole Egg Powder (RM 8415), which was prepared in the same way as the egg samples. The proposed method including sample emulsification for subsequent Se determination for GF AAS is simpler and requires fewer reagents when compared with other sample pre-treatment procedures.

**Keywords:** Selenium, emulsion, eggs, electrothermal atomic absorption spectrometry

En este estudio se ha desarrollado un método para determinar Selenio (Se) en huevos enteros por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito sin ningún procedimiento de digestión, pero preparando una emulsión que contiene un surfactante aniónico, la muestra de huevo, aceite y agua. Se han realizado varios experimentos para determinar la cantidad mínima del surfactante y las diferentes concentraciones de aceite necesarios para formar una emulsión estable. Los mejores resultados se obtuvieron con 2,0 % (w/v) Tween 80; 2,0 % (w/v) aceite de maíz y 2,0 % (w/v) de muestra de huevo en agua. La emulsión se preparó según un método clásico, que consiste en mezclar ambas fases a 60 °C con un agitador magnético (3000 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente (22 °C). Las mediciones con GF AAS se realizaron utilizando una calibración de adición de estándar y con Pd como modificador. La precisión, expresada como desviación estándar relativa, fue menor al 5 % y el límite de detección fue de 1,02 µg/L. La validación del método se realizó con Polvo de Huevo Entero (RM 8415), un material de referencia estándar, que fue preparado de la misma manera que las muestras de huevo. Comparado con otros procedimientos de tratamiento previo de muestras, el método propuesto, incluso el preparar la emulsión para determinar luego Se por GF AAS, es más simple y requiere menos reactivos.

**Palabras clave:** Selenio, emulsión, huevo, espectrometría de absorción atómica electrotérmica

### Introducción

El Se es un elemento traza esencial para animales y seres humanos. Su principal fuente son los alimentos [1]. Los huevos son muy importantes, pues brindan una cantidad significativa de Se en formas biológicamente aprovechables y tienen un alto valor nutricional [2]. Además, se han elaborado e introducido al mercado huevos enriquecidos con Se, que han logrado una gran popularidad [3].

Existen varios procedimientos para determinar Se en muestras biológicas, sobre todo en alimentos [4]. A menudo se lo determina por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GF AAS) o por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG AAS) [5]. La selección del método óptimo depende de la composición de la matriz y de las especies de selenio en la muestra [6]. Mientras que la respuesta de la técnica HG AAS depende mucho de la especie de selenio, la técnica GF AAS es adecuada para las mediciones de especies orgánicas e inorgánicas del selenio. Los métodos publicados de tratamiento de muestras incluyen digestión con ácidos y peróxidos [7, 8]; hubo intentos de mejorar la digestión de la muestra combinando

estos reactivos con una radiación ultravioleta [9] o de microondas [10, 11]. Esto implica pasos adicionales, que pueden causar inconvenientes tales como errores de muestreo, contaminación o pérdidas durante el proceso [4]. Los ácidos pueden interferir en mediciones por HG AAS y GF AAS; además, resultados de Se probablemente inexactos pueden atribuirse a la resistencia de los compuestos de Se a oxidarse y a la volatilidad de ciertas especies de selenio, sean presentes o formados en el proceso [5].

El huevo es un sistema naturalmente emulsionado, pero, debido a su alta viscosidad y alto contenido de materia orgánica, su introducción directa en el horno presenta una dificultad muy particular [12]. La emulsión directa con surfactantes brinda un procedimiento rápido en la preparación de la muestra, ya que este acercamiento no requiere la destrucción de la matriz orgánica [13]. Simplemente, se reduce la viscosidad y el contenido orgánico de la muestra, manteniendo la homogeneidad del sistema y su estabilidad. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método para la determinación de Se por GF AAS en huevos enteros de gallina, preparando un sistema de emulsión con un surfactante aniónico, muestra de huevo, aceite y agua.



## **ANEXO 7**

---

### **SURFACTANT/OIL/WATER SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF SELENIUM IN EGGS BY GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY**

**C.V.S. Ieggli, S.M.S. NoreMBERG, D. Bohrer, P.C. do Nascimento, L.M. de  
Carvalho**

Tenth Rio Symposium on Atomic Spectrometry  
Bahia (2008).

12  
11  
10  
9  
8  
7



# *Tenth Rio Symposium on Atomic Spectrometry*

7-12 September 2008 - Salvador - Bahia - Brazil

## CERTIFICATE

We certify that the Scientific Contribution entitled

**"Surfactant/oil/water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry"**

Has been presented at the  
**Tenth Rio Symposium on Atomic Spectrometry**  
authored by

**Carine V.S. Iegli, Denise Bohrer, Simone M.S. Noremberg, Paulo Cícero do Nascimento and  
Leandro Machado de Carvalho**

Dr. Bernhard Welz  
Organizing Committee

Dr. Sérgio L. C. Ferreira  
Organizing Committee