

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Gabriela Camera Leal

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA**

Santa Maria, RS
2018

Gabriela Camera Leal

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM SUPLEMENTOS
ALIMENTARES POR ABSORÇÃO ATÔMICA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carine Viana Silva

Santa Maria, RS
2018

Leal, Gabriela Camera

Determinação de impurezas elementares em suplementos alimentares por Espectrometria de Absorção Atômica / Gabriela Camera Leal.- 2018.

90 p.; 30 cm

Orientadora: Carine Viana Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Suplementos alimentares 2. Impurezas elementares
3. Espectrometria de Absorção Atômica I. Silva, Carine Viana II. Título.

Gabriela Camera Leal

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM SUPLEMENTOS
ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 02 de agosto de 2018:



Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Patricia Gomes, Dra. (UFN)



Liziane Maahs Flores, Dra. (UFSM)

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por tudo o que Ele representa na minha vida, aos meus pais, Elsi e Pedro, e ao meu noivo, Thiago Lazzari, que me inspiraram e sempre me incentivaram a busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- à Deus por tudo;

- a minha orientadora, Prof. Dra. Carine Viana Silva, que me concedeu o prazer de ser sua aluna e o imenso privilégio de ser sua orientada. Muito obrigada pelas constantes e produtivas orientações, pela dedicação e companheirismo que tanto contribuíram para com a minha formação acadêmica e para com a composição desta dissertação;

- aos professores, Leandro, Paulo e Denise que contribuíram com ensinamentos desde a graduação, obrigada por todas as contribuições;

- a meus pais e demais familiares, pela imensa dedicação, amor e compreensão, por sempre me acompanhar com bons pensamentos;

- ao meu noivo Thiago Lazzari, companheiro, amigo, cúmplice, que sempre confiou no meu potencial e, por isso, me incentiva, ajuda, sonha comigo e torna meus dias muito mais felizes. Agradeço ainda, pela compreensão e paciência;

- aos colegas de laboratório, cada um de certa forma contribuiu com este trabalho, em especial a Patricia Mattiazzi por todo conhecimento compartilhado, pela paciência com uma iniciante na absorção atômica e pelos conselhos, a Patrícia Schmidt por todo apoio e pela compreensão, principalmente por dividir comigo todas as angústias do nosso mestrado, a Rejane pelas conversas e risadas, por ser tão parecida comigo e compreender meus dramas, a Diana por todos os momentos vividos e pelas conversas sinceras, a Carolina por todas as sextas de descontração, por todas as tardes de conversa e por todo incentivo; ao Luís Claussen por aguentar todas essas mulheres, por sempre estar presente e nos apoiando, a “mãe” Sandra por todos os abraços e por todos os conselhos e ao Luis Ferraz por todo ensinamento. Agradeço a esse grupo de colegas que se tornaram grandes amigos e sem o apoio de vocês esse trabalho não existiria;

- as colegas de faculdades e eternas amigas Carla, Everlin, Isadora, Jociele, Kamila, Larissa, Letícia e Lisiane, mesmo com a distância e rumos diferentes que cada uma seguiu, a amizade sempre prevaleceu, obrigada por todo apoio e por todo pensamento positivo;

- ao CNPQ por fornecer o apoio financeiro para a realização deste trabalho de pesquisa.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo, afinal a concretização desse trabalho ocorreu pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas.

A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.

Jonh Ruskin

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

AUTOR: Gabriela Camera Leal
ORIENTADOR: Carine Viana Silva

Este trabalho apresenta um estudo de determinação de arsênio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em suplementos alimentares por espectrometria de absorção atômica. Os suplementos alimentares são obtidos de forma sintética e derivados de plantas, podendo ocorrer a contaminação de metais e metalóides devido ao ambiente industrial, características geoquímicas do solo, entre outras formas. Os métodos para a determinação de Pb e Cd foram desenvolvidos em espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua equipado com forno de grafite com amostragem direta (HR-CS SS GFAAS) e o método para a determinação de As foi desenvolvido em espectrômetro de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS) com decomposição das amostras por digestão ácida. A quantidade de Pb, Cd e As foram determinadas em 72 suplementos alimentares disponíveis no mercado brasileiro. Para os métodos desenvolvidos em HR-CS SS GFAAS as plataformas foram revestidas com zircônio e o uso de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificadores químicos aumentaram o desempenho analítico. Os parâmetros de desempenho dos métodos estavam de acordo com as normas da Farmacopeia Americana para análise inorgânica em suplementos alimentares. A precisão, expressa como desvio padrão relativo, foi de menor que 5% para os métodos por HR-CS SS GFAAS e menor que 6,1% para o método por HG AAS. Os limites de detecção foram 2,16 pg para Pb, 0,47 pg Cd e 0,37 $\mu\text{g/L}$ As. Os conteúdos dos elementos nas amostras variaram na faixa de 0,04 a 1,68 $\mu\text{g/g}$ para o Pb, 0,01 a 0,37 $\mu\text{g/g}$ para o Cd e o conteúdo de As variou na faixa de 0,02 a 0,73 $\mu\text{g/g}$. A farmacopeia americana preconiza limites de 10 $\mu\text{g/dia}$ Pb e 5 $\mu\text{g/dia}$ Cd. Quatro produtos apresentaram quantidades de Pb acima do permitido e uma amostra apresentou Cd acima das quantidades aceitáveis. A contaminação de suplementos alimentares por estes elementos é preocupante, mesmo em baixas concentrações, uma vez que a exposição crônica pode causar graves efeitos deletérios à saúde.

Palavra-chave: Absorção Atômica, Metais, Metalóide, Suplementos Alimentares.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ELEMENTARY IMPURITIES IN FOOD SUPPLEMENTS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

AUTHOR: Gabriela Camera Leal

ADVISOR: Carine Viana Silva

This work presents a study of the determination of arsenic, cadmium and lead in food supplements by atomic absorption spectrometry. Food supplements are obtained in synthetic form and derived from plants, and contamination of metals and metalloids may occur due to the industrial environment, soil geochemical characteristics, among other forms. The methods for the determination of Pb and Cd were developed in high resolution atomic absorption spectrometer with continuous source equipped with graphite furnace with direct sampling and the method for the determination of As was developed in atomic absorption spectrometer with generation of hydrides with decomposition of the samples by acid digestion. The concentration of lead, cadmium and arsenic were determined in 72 food supplements available in the Brazilian market. For the methods developed in HR-CS SS GFAAS the platforms were coated with Zr and the use of $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ with chemical modifiers presented better analytical performance. The performance parameters of the methods were in accordance with the standards of the American Pharmacopoeia for inorganic analysis in food supplements. The precision, expressed as relative standard deviation, was less than 5% for the HR-CS SS GFAAS methods and less than 6.1% for the HGAAS method, and the detection limits were 2.16 pg for Pb, 0.47 pg Cd and 0.37 $\mu\text{g/L}$ As. The content of metals and metalloids in the samples ranged from 0.04 to 1.68 $\mu\text{g/g}$ for Pb, 0.01 to 0.37 $\mu\text{g/g}$ for Cd and As content varied from 0.02 to 0.73 $\mu\text{g/g}$. The American Pharmacopoeia recommends limits of 10 $\mu\text{g/day}$ Pb and 5 $\mu\text{g/day}$ Cd. Four products had amounts of Pb above the allowed one and a sample had Cd above the acceptable amounts. Contamination of dietary supplements by these elements is of concern, even at low concentrations, since chronic exposure can cause serious deleterious health effects.

Keyword: Atomic Absorption, Metals, Metalloids, Food Supplements.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Espectro obtido a partir da solução de 10 g/L SiO₂ e do modificador químico contendo Pd(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂.....50
- Figura 2 - Correção de fundo com o sistema LSBC em uma amostra de suplemento alimentar: (A) espectro sem correção e (B) espectro submetido à correção LSB.51
- Figura 3 - Estudo da massa de amostra para determinação de Pb em amostra de suplemento alimentar por CS-HR SS GFAAS. As barras verticais indicam o desvio padrão relativo calculado para n=3..... 52
- Figura 4 - Estudo da massa de amostra para determinação de Pb no material de referência certificado do NIST contendo Citrus Aurantium (SRM 3260) por CS-HR SS GFAAS. As barras verticais indicam o desvio padrão relativo calculado para n=3.....53
- Figura 5 - Estimativa do fator de homogeneidade (H_e) para Pb em amostras de suplemento alimentar..... 54
- Figura 6 - Perfil dos sinais de Pb (A) para amostra de suplemento alimentar mais 10 µg/L Pb; e (B) para solução aquosa de 10 µg/L Pb.....55
- Figura 7 - Curvas de atomização e pirólise para o chumbo em amostra de suplemento alimentar. (■) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar com 2 µL Mg(NO₃)₂ e 3 µL Pd(NO₃)₂; (●) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar sem modificador.....57
- Figura 8 - Especificidade de uma amostra de suplemento alimentar: (A) 10 µg/L Pb e (B) 10 µg/L As, Pb e Cd..... 58
- Figura 9 - Estudo da massa de amostra para determinação de Cd em amostra de suplemento alimentar. As barras verticais indicam o desvio padrão relativo calculado para n=3..... 62
- Figura 10 - Estimativa do fator de homogeneidade (H_e) para Cd em amostras de suplementos alimentares.....63
- Figura 11 - Sinais de cádmio na amostra de suplemento alimentar (A) e em solução aquosa (B).....63
- Figura 12 - Curvas de atomização e pirólise para o cádmio em amostra de suplemento alimentar adicionadas de 10 µL da solução padrão de Cd. (●) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra com 2µL Mg(NO₃)₂ e 3µL Pd(NO₃)₂; (■) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar com 5µL Pd(NO₃)₂; e (▲) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar sem modificador..... 65
- Figura 13 - Especificidade de uma amostra de suplemento alimentar: (A) 10 µg / L Cd e (B) 10 µg / L As, Pb e Cd.....66
- Figura 14 - Estudo da concentração de NaBH₄ na determinação de As. Condições: HCl 3% (m/v) e Amostra 17 adicionada com 10 µg/L As..... 75
- Figura 15 - Estudo da concentração de HCl na determinação de As. Condições: 0,8% NaBH₄, 0,15% NaOH e Amostra 17 adicionada de 10 µg/L As..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites de impurezas elementares em suplementos alimentares, de acordo com a Farmacopeia americana.	23
Tabela 2 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CS GFAAS e programa de temperatura para a determinação de Pb e Cd após otimização.....	46
Tabela 3 – Parâmetros de operação do equipamento HG AAS para a determinação de As. .	46
Tabela 4 - Programa de aquecimento para o recobrimento do forno de grafite com Zr.	56
Tabela 5- Figuras de mérito para determinação de Pb em suplementos alimentares usando HR-CS SS GFAAS. $T_{pir}=1300^{\circ}C$, $T_{at}=2100^{\circ}C$, $\lambda=283.306\text{ nm}$	59
Tabela 6- Limites de detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos para o chumbo em suplementos alimentares usando diferentes técnicas e procedimentos analíticos.....	60
Tabela 7 - Resultados de exatidão do método proposto através do ensaio de recuperação de padrão de chumbo adicionado à amostra de suplementos alimentares.	61
Tabela 8 - Figuras de mérito para determinação de Cd em suplementos alimentares usando HR-CS GF AAS. $T_{pir}=700^{\circ}C$, $T_{at}=1700^{\circ}C$, $\lambda=228,80\text{ nm}$	67
Tabela 9 - Limites de detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos para o cádmio em suplementos alimentares usando diferentes técnicas e procedimentos analíticos.....	68
Tabela 10 - Resultados de exatidão do método proposto para determinação de chumbo em amostras de suplementos alimentares.....	69
Tabela 11 – Concentração de chumbo e cádmio em suplementos alimentares.....	71
Tabela 12 – Concentração de chumbo e cádmio em suplementos alimentares.....	72
Tabela 13 – Concentração de chumbo e cádmio em suplementos alimentares.....	73
Tabela 14 - Figuras de mérito para determinação de As em suplementos alimentares usando HGAAS.	77
Tabela 15 - Limites de detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos para o arsênio em suplementos alimentares usando diferentes técnicas e procedimentos analíticos.....	78
Tabela 16 - Resultados de exatidão do método proposto para determinação de arsênio em amostras de suplementos alimentares.....	79
Tabela 17 - Concentração de arsênio em suplementos alimentares.	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Categoria de produtos que podem ser utilizados para complementar a dieta e as respectivas legislações brasileiras pertinentes.....	19
Quadro 2- Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIAD	Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para fins especiais e congêneres
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Comitê Europeu
BRASNUTRI	Associação Brasileira dos Fabricantes de Suplementos Nutricionais e Alimentos para Fins Especiais
CRM	Materiais de Referência Certificados
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DDR	Dose Diária Recomendada
DSHEA	<i>Dietary Supplement Health and Education Act</i>
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (do inglês <i>Food and Drug Administration</i>)
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>)
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HGAAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês <i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HR-CS SS GFAAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua equipado com de forno de grafite (do inglês <i>High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICP-AES	Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively coupled plasma – Atomic Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i>)
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente. (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry</i>)
IDR	Ingestão Diária Recomendada
LS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Fonte de Linha
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>Limits of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limits of quantification</i>)
MIPs	Medicamentos Isentos de Prescrição
MS	Ministério da Saúde
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
USP	Farmacopeia Americana (do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>)
WADA	Agência Mundial Antidoping (do inglês <i>World Anti-Doping Agency</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	17
2.2	LEGISLAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	19
2.3	IMPUREZAS ELEMENTARES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	24
2.4	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	26
2.4.1	Análise direta de sólidos por Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (HR-CS GFAAS)	27
2.4.2	Espectrometria de Absorção Atômica de Geração de Hidretos (HGAAS)	31
3.	METODOLOGIA	34
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	34
3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	34
3.3	PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO	35
3.4	AMOSTRAS	35
3.5	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HG AAS	45
3.6	DETERMINAÇÃO DE Pb e Cd POR HR-CS SS GFAAS	45
3.7	DETERMINAÇÃO DE As POR HGAAS	46
3.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	47
3.8.1	Exatidão	47
3.8.2	Precisão	47
3.8.3	Linearidade e faixa de concentração.....	47
3.8.4	Limites de quantificação e detecção	48
3.8.5	Especificidade.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	DECOMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	49
4.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb POR HR-CS SS GFAAS.....	49
4.3	VALIDAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb	57
4.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE Cd POR HR-CS SS GFAAS	61
4.5	VALIDAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Cd.....	65
4.6	DETERMINAÇÃO DE Cd e Pb NAS AMOSTRAS.....	69
4.7	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE As POR HGAAS	74
4.8	VALIDAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE As POR HG AAS.....	76
4.9	DETERMINAÇÃO DE As NAS AMOSTRAS	79
5	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

O *Food and Drug Administration* (FDA) é o órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, promovendo a proteção da saúde da população. Segundo o FDA, *dietary supplements* são produtos que podem conter múltiplos ingredientes, incluindo vitamina, minerais, ervas, aminoácidos, substâncias dietéticas para suplementar a dieta aumentando a ingestão dietética total, concentrados, metabólitos, constituintes e extratos, a combinação de um ou mais destes ingredientes (USA, 2016).

O uso de suplementos alimentares é muito difundido no Brasil, porém pouco se discute sobre a qualidade dos suplementos alimentares. A contaminação dos suplementos alimentares por diferentes elementos pode ocorrer durante o processo de industrialização, podendo ser causada por ambiente contaminado, poluentes antropogênicos ou armazenamento inadequado. Com aumento da industrialização e da poluição ambiental é necessário controlar a quantidade de alguns elementos que mesmo em concentrações baixas, devido a ingestão diária, podem causar efeitos tóxicos ao consumidor (AMSTER, TIWARY, SCHENKER, 2007; SZOK, KURZAWA, SZLYK, 2015).

Certos países estabelecem limites de contaminantes inorgânicos para os *dietary supplements*, como por exemplo a Farmacopeia Americana (USP) e o Comitê Europeu (CE). Em 2017, a Farmacopeia americana (USP) em seu capítulo 2232 definiu novos limites para contaminantes elementares em suplementos alimentares, entre eles o cádmio, o chumbo e o arsênio (USP, 2017d).

No Brasil, não existe uma categoria similar aos produtos definidos como “*dietary supplements*” pelo FDA, portanto não existe uma legislação brasileira que determine os limites de contaminantes inorgânicos especificamente para estes produtos. Grande parte dos suplementos são vendidos nas categorias de alimentos para atletas e suplementos vitamínicos e/ou minerais (BRASIL, 1998; BRASIL, 2002). Este tipo de produto não precisa comprovar a segurança, podendo ser comercializado logo após notificar o início de fabricação à agência sanitária (BRASIL, 2010 a; BRASIL, 2010 b). Os suplementos com registro obrigatório são minoria, como por exemplo a categoria de novos alimentos, devem apresentar laudo de análise dos contaminantes inorgânicos como o chumbo, arsênio e cádmio (BRASIL, 1965; BRASIL, 1999a; BRASIL, 2016 e).

O capítulo 233 da USP determina as técnicas de espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES do inglês *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-

MS do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) para avaliar os elementos (USP, 2017a). No entanto, os equipamentos de espectrometria de absorção atômica apresentam alta sensibilidade e especificidade para a análise de componentes inorgânicos. Desta forma, as técnicas de HR-CS GFAAS e HGAAS se tornam também uma alternativa viável para esta análise e ainda tem a vantagem de determinar chumbo e cádmio por análise direta, a qual evita contaminações cruzadas devido ao processo de digestão da amostra e diminui o tempo de análise (KURFÜRST, 1998; NOMURA, SILVA, OLIVEIRA, 2008; WELZ et al., 2010). Além de tornar a análise possível de ser adaptada a realidade de um maior número de laboratórios analíticos. Devido à ausência de uma legislação brasileira que determine os valores permitidos destes elementos em suplementos alimentares serão considerados os valores de dose diária máxima determinados pela Farmacopeia Americana (USP, 2017d).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O trabalho desenvolvido teve por objetivo determinar impurezas elementares em suplementos alimentares comercializados no Brasil por Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua equipado com Atomizador de Forno de Grafite (HR-CS GFAAS) e por Espectrometria de Absorção Atômica de Geração de Hidretos (HGAAS).

1.1.2 Objetivos específicos

Realizar amostragem ($n \geq 70$) de suplementos alimentares comercializados no mercado virtual brasileiro e em lojas especializadas na cidade Santa Maria-RS;

Realizar uma análise descritiva das amostras de suplementos adquiridas de acordo com a composição declarada pelo fabricante;

Desenvolver e validar um método para a determinação de Cd e Pb por HR-CS GFAAS, em suplementos alimentares;

Aplicar o método validado para a determinação de Cd e Pb em amostras de suplementos alimentares por HR-CS GFAAS;

Investigar um procedimento de digestão de amostra eficiente para a técnica de HGAAS;

Desenvolver e validar um método para a determinação de As por HGAAS em suplementos alimentares

Aplicar o método validado para a determinação de As em amostras de suplementos alimentares por HGAAS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Frequentadores de academia envolvidos em programas de exercícios com pesos desejam modificações estéticas, principalmente emagrecimento e aumento da massa muscular. Paralelo ao aumento do número de pessoas praticantes de atividade física, observa-se também o uso crescente e indiscriminado de suplementos alimentares e substâncias com finalidades ergogênicas. O consumo destes produtos é elevado em diversas regiões do Brasil, assim como nos Estados Unidos, países da Europa e da Ásia (NOGUEIRA et al., 2015).

Nos Estados Unidos a FDA regulamenta suplementos alimentares através da Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, *Dietary Supplement Health and Education Act* de 1994 (DSHEA). De acordo com a DSHEA, os suplementos alimentares são produtos para suplementar a dieta que pode conter os seguintes ingredientes: vitamina, aminoácido, mineral, planta, metabólitos ou a combinação de qualquer um desses ingredientes (GAO, 2009).

Na legislação brasileira não existe uma categoria definida como suplemento alimentar. Os produtos conhecidos mundialmente como “*dietary supplement*” podem ser enquadrados em algumas categorias de produtos como suplementos vitamínicos e/ou minerais (BRASIL, 1998), alimentos para atletas (BRASIL, 2010a), novos alimentos (BRASIL, 1999a) e substâncias bioativas com alegações de propriedade funcional (BRASIL, 1999c). São produtos usados no caso de a dieta não atender a uma demanda do organismo em função de uma situação fisiológica distinta ou mesmo para complementação das necessidades diárias. Geralmente estes produtos apresentam-se em formas não convencionais de alimentos tais como cápsulas, comprimidos e tabletes. É importante ressaltar que muitos dos produtos considerados como suplementos alimentares, em outros países, podem não ser considerados alimentos no Brasil por conterem substâncias terapêuticas ou medicamentosas, que não são admitidas em produtos alimentícios (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2016b).

A Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Para Fins Especiais e Congêneres (ABIAD) realizou uma pesquisa para avaliar o consumo de suplemento no país, foram entrevistados 1007 famílias de todo o país. Conforme o levantamento, 54% dos lares possuem pelo menos um indivíduo que consome algum tipo de suplemento, sendo que 75% utilizam para complementar a alimentação (vitaminas, proteínas, minerais, etc) e 57% buscam promover o bem-estar (aumento de massa muscular, energia, entre outros) (ABIAD, 2016).

Segundo a Associação Brasileira dos Fabricantes de Suplementos Nutricionais e Alimentos para Fins Especiais (BRASNUTRI), a indústria de suplementos alimentares teve um crescimento de 12 % em sua produção em 2015, com um faturamento em torno de R\$ 1,32 bilhões (BRASNUTRI, 2016). O crescimento no consumo destes produtos acontece principalmente devido a uma demanda induzida pelo forte apelo publicitário, que é caracterizado pela variedade de benefícios veiculados nos materiais promocionais. Além disso, a facilidade no acesso, como por exemplo a venda em *websites*, e a crescente preocupação da população com a saúde contribuem para a popularização dos suplementos alimentares (BRASIL, 2016b).

Pesquisas realizadas em outros países demonstram que os consumidores utilizam esses produtos pelas mais variadas razões, como por exemplo, para a promoção da saúde e melhora do rendimento esportivo. Entretanto, segundo o Guia Alimentar da População Brasileira, publicado pelo Ministério da Saúde, não existe qualquer orientação para a ingestão de suplementos alimentares, pelo contrário, traz orientações para a adoção de uma alimentação balanceada capaz de fornecer todos os nutrientes necessários (BRASIL, 2016b).

O consumo abusivo de suplementos alimentares pode representar um risco de saúde para os consumidores. O número de relatos de casos de efeitos adversos à saúde decorrentes do uso de suplemento nos últimos anos aumentou, os mais afetados são atletas amadores, e o problema mais comum é hepatotoxicidade (DERAVE; TIPTON, 2014).

Em 2012, a ANVISA emitiu um comunicado sobre o uso indiscriminado de suplementos alimentares. A agência ainda ressaltou que alguns produtos apresentavam ingredientes que não são seguros para o consumo ou que poderiam conter substâncias com propriedades terapêuticas, que não podem ser consumidas sem acompanhamento médico (BRASIL, 2012a).

A diversidade de alimentos para atletas disponíveis no mercado vem crescendo no país a cada ano. Graças ao avanço tecnológico, novos ingredientes são introduzidos rapidamente no mercado, nem sempre com a devida comprovação de segurança de uso. O fácil acesso a estes produtos, aliado ao estímulo de consumo dentro de academias e à influência da mídia, exigem atenção da Anvisa. A dificuldade para exercer o controle fiscal desta diversidade de produtos no mercado, aliada à isenção de registro obrigatório desta categoria de alimentos, pode facilitar a prática de ilegalidades na produção e no comércio (ABE-MATSUTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015).

O estudo de Silva e Ferreira (2014) comprovou que é comum o descumprimento das normas de rotulagem; a presença de ingredientes não constantes na lista de ingredientes afeta

diretamente a prática do nutricionista, que só pode se basear nas informações contidas no rótulo (SILVA; FERREIRA, 2014).

2.2 LEGISLAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dos suplementos alimentares é a Anvisa, que nos últimos anos vem aumentando a sua atuação através de determinações legais, visando a qualidade e a segurança desses produtos. Tanto os produtos importados como os fabricados no Brasil, devem ser enquadrados em legislações específicas. O quadro 1 apresenta as categorias de produtos que podem ser utilizados para complementar a dieta e as respectivas legislações brasileiras que estes se enquadram.

Quadro 1 - Categoria de produtos que podem ser utilizados para complementar a dieta e as respectivas legislações brasileiras pertinentes.

(continua)

Categoria	Definição legal do produto	Legislação
Suplementos de vitaminas e/ou minerais	Alimentos para o fornecimento da ingestão diária de vitaminas e/ou minerais de uma pessoa saudável.	Portaria MS nº 32/1998
Novos alimentos e novos ingredientes	Sem histórico de consumo no país, ou alimentos já consumidos, mas contendo substâncias mais elevadas do que está presente normalmente na dieta. Exemplos: lecitina de soja, Goji berry.	RDC Anvisa nº 16/1999
Alimentos com propriedades funcionais e saúde	Propriedades funcionais: papel metabólico ou fisiológico no crescimento, desenvolvimento e manutenção de outras funções. Alegações de saúde: indicar, sugerir ou implicar uma relação entre o alimento ou ingrediente com uma doença ou uma condição relacionada com a saúde. Exemplos: Proteína de soja, polidextrose, dextrina.	RDC Anvisa nº 18/1999
Substâncias bioativas e probióticos	Substâncias bioativas: nutrientes ou não nutrientes com ação metabólica ou fisiológica específica. Exemplos: Ácido fenólico, ômega 3 e 6, catequinas. Probióticos: Microorganismos vivos que melhoram o equilíbrio microbiológico intestinal. Exemplo: <i>Bifidobacterium</i> sp.	RDC Anvisa nº 02/2002
Alimentos para atletas	Especialmente formulado para atingir necessidades nutricionais específicas e melhorar o desempenho. Exemplos: Proteína do soro de leite, creatina e cafeína.	RDC Anvisa nº 18/2010

Quadro 2 - Categoria de produtos que podem ser utilizados para complementar a dieta e as respectivas legislações brasileiras pertinentes.

(continuação)

Fitoterápicos	<p>Medicamento Fitoterápico: são produtos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia são baseadas em evidências clínicas e caracterizados pela constância de sua qualidade, passíveis de registro e notificação. Considerado medicamento. Exemplo: <i>Zingiber officinale</i> R.</p> <p>Produto Tradicional Fitoterápico: produtos contendo matéria prima vegetal cuja segurança e efetividade seja comprovada. Concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico. Exemplo: <i>Passiflora edulis</i> S.</p>	RDC Anvisa nº 26/2014
---------------	--	-----------------------

Fonte: Autor

Os suplementos vitamínicos e/ou minerais servem para contemplar com estes nutrientes a dieta de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão a partir da alimentação seja insuficiente. Esses suplementos devem conter pelo menos 25% e no máximo 100% da dose diária recomendada (DDR) de vitaminas e minerais para os brasileiros. Os suplementos não apresentam funções curativas, sendo proibida qualquer expressão que se refira ao seu uso para prevenir, aliviar ou tratar uma doença (BRASIL, 1998).

No Brasil, a maioria dos produtos disponíveis no mercado são vendidos como alimentos para atletas e suplementos vitamínicos e/ou minerais, categorias isentas de registro. Entretanto, estudos relatam que existem produtos vendidos de forma irregular nestas categorias para se favorecer da isenção de registro. Geralmente são produtos que deveriam estar registrados na Anvisa como substâncias bioativas (BRASIL, 2002), ou como novos alimentos (BRASIL, 1999a) e como alimentos com alegação de propriedade funcional (BRASIL, 1999c) (SILVA; FERREIRA, 2014).

Novos alimentos são alimentos sem tradição de consumo no país, alimentos que contenham novos ingredientes ou alimentos que contenham substâncias já consumidos, mas que venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos que compõem uma dieta regular. Também se enquadram nesta categoria alimentos com forma de apresentação não convencional na área de alimentos, tais como cápsulas, comprimidos, tabletes e similares (BRASIL, 1999a).

A existência de uma relação entre o consumo de determinado alimento ou seu constituinte e a saúde podem ser veiculadas somente se forem atendidas as diretrizes definidas pela Anvisa para comprovação de propriedades funcionais ou de saúde (BRASIL, 1999b). O objetivo da norma, além da segurança do alimento, é que as alegações sejam comprovadas cientificamente e não induzam o consumidor ao engano. As alegações podem descrever o papel fisiológico do ingrediente no crescimento, desenvolvimento ou mesmo nas funções normais do organismo. As alegações podem também fazer referência à manutenção geral da saúde e à redução do risco de doenças. Os alimentos que veiculem essas alegações devem ser registrados na categoria de alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde ou na categoria de substâncias bioativas e probióticos (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c; BRASIL, 2016c).

Alimentos com alegação de propriedade funcional são aqueles tem ação sob o papel metabólico ou fisiológico no crescimento, desenvolvimento ou manutenção do organismo humano. Por outro lado, os alimentos com propriedade de saúde são os que possuem relação com doença ou condição relacionada à saúde. Ambas alegações de propriedade funcional e de saúde devem estar baseadas em ensaios clínicos conduzidos com metodologia adequada ou em estudos epidemiológicos. Os resultados devem demonstrar a associação entre o alimento e o efeito benéfico à saúde, com pouca ou nenhuma evidência em contrário. É fundamental que a substância ou constituinte para o qual é feita a solicitação de alegação tenha a mesma especificação daquela utilizada nos estudos apresentados (BRASIL, 1999b).

As diretrizes que devem ser adotadas para a avaliação de segurança, registro e comercialização de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional ou de saúde são previstas na RDC Anvisa nº 02/2002. Os produtos são classificados em: carotenoides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolipídeos, organossulfurados, polifenóis e probióticos. Os produtos se apresentam geralmente em formas farmacêuticas como cápsulas, comprimidos, tabletes, pós, granulados, pastilhas, suspensões e soluções (BRASIL, 2002).

A RDC da Anvisa nº 18 de 2010 estabelece a classificação, designação, requisitos de composição e de rotulagem da categoria “Alimentos para Atletas”. Esta resolução se aplica aos alimentos especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades funcionais específicas e auxiliar no desempenho do exercício. Estes são classificados em seis grupos: (I) suplemento hidroeletrolítico; (II) suplemento energético; (III) suplemento proteico; (IV) suplemento para substituição parcial de refeições; (V) suplemento de creatina e (V) suplemento de cafeína. Não se aplicam nesta legislação substâncias estimulantes, hormônios ou outra substância considerada como “*doping*” contido na lista de substâncias proibidas pela

Agência Mundial Antidoping e substâncias com ação ou finalidade terapêutica ou medicamentosa, incluindo produtos fitoterápicos (BRASIL, 2010a).

Nos rótulos dos produtos classificados como Alimentos para Atletas, deve constar a seguinte frase em destaque: "Este produto não substitui uma alimentação equilibrada e seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico". Não pode constar imagens ou expressões que induzam o consumidor a engano quanto a efeitos que não possuam referentes à perda de peso ou ganho de massa muscular; nem imagens ou expressões que façam referências a hormônios ou outras substâncias farmacológicas; as expressões "anabolizantes", "hipertrofia muscular", "massa muscular", "queima de gorduras", "*fat burners*", "aumento da capacidade sexual", "anabólico" (BRASIL, 2010a).

Os vegetais são fontes de minerais e compostos bioativos, desta forma fitoterápicos também podem ser usados como suplementos alimentares. No Brasil, os medicamentos fitoterápicos são considerados produtos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas vegetais cuja segurança e eficácia são baseadas em evidências clínicas e caracterizados pela constância de sua qualidade (BRASIL, 2016d). A regulação destes produtos nos últimos anos tem se tornado mais rigorosa e, atualmente, os medicamentos fitoterápicos devem ser obrigatoriamente registrados na Anvisa. Entretanto, os produtos tradicionais fitoterápicos e os chás medicinais que possuem longo histórico de uso seguro e efetivo, podem ser colocados à venda sob notificação (BRASIL, 2014). A diferença é que enquanto o registro requer a apresentação de testes científicos, a notificação é um procedimento simplificado em que não exige tais comprovações (BRASIL, 2016d).

A Portaria da Anvisa nº 269/2005 estabelece a ingestão diária recomendada (IDR) para vitaminas, minerais e aminoácidos. Os produtos que contêm estas substâncias acima da IDR são caracterizados como “Medicamentos Específicos” e regulados pela RDC Anvisa nº 132/2003 (BRASIL, 2003). Todavia, estes produtos podem também ser usados como suplementos alimentares pelos consumidores uma vez que muitos são medicamentos isentos de prescrição (MIPs), conforme regulamentado pela RDC da Anvisa nº 98/2016 (BRASIL, 2016f).

A regulamentação sanitária brasileira permite que pessoas físicas importem suplementos alimentares para consumo próprio, mesmo que esses produtos não estejam regularizados na Anvisa. Todavia, esses produtos não podem ser importados com finalidade de revenda ou conter substâncias sujeitas a controle especial ou proscritas no país. Caso sejam importados para comercialização, devem obedecer às legislações brasileiras para a categoria do produto (BRASIL, 2002; BRASIL, 2012b).

Em 2010, tendo em vista o elevado número de pedidos de registro em relação à sua capacidade de inspeção, a Anvisa dispensou o registro de 15 categorias de alimentos prevendo reduzir 47% do número de registros de alimentos (SILVA; FERREIRA, 2014). A partir de então, ficaram isentos de registro os alimentos para controle de peso e alimentos para dietas com restrição de nutrientes, alimentos para atletas e os suplementos vitamínicos ou minerais (BRASIL, 2010b). Contudo, independente da necessidade de registro, os fabricantes devem atender às normas técnicas específicas de fabricação e comercialização do alimento de acordo com a categoria na qual o produto se enquadra, bem como produzi-los conforme estipulado pela legislação sanitária (SILVA; FERREIRA, 2014).

Na análise de Silva & Ferreira (2014), a exigência do registro dos alimentos para atletas atendia preceitos da segurança alimentar do consumidor, de modo que esta decisão da Anvisa flexibiliza e torna menos rígido o controle destes produtos. Vários estudos demonstram que a fiscalização da Anvisa não é suficiente e existem muitos produtos sendo comercializados de forma irregular, ainda que a maioria dos fabricantes ignora ou perverte as normas para comercialização no Brasil (SILVA, FERREIRA, 2014).

Em 2017, a Farmacopeia americana (USP) definiu no seu Capítulo 2232 limites para contaminantes elementares em suplementos dietéticos. Os limites fixados para os quatro contaminantes elementares em suplementos dietéticos são: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg), conforme descrito na Tabela 1 (USP, 2017d).

Tabela 1 - Limites de impurezas elementares em suplementos alimentares, de acordo com a Farmacopeia americana.

Elemento	PDE (µg/dia)
Arsênio (inorgânico)	15
Cádmio	5
Mercúrio (total)	15
Metilmercúrio	2
Chumbo	10

* Exposição Diária Permitida (PDE) é derivado da dose semanal tolerável provisória (PTWI) que é recomendado pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas e Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) subtraindo a exposição diária (µg/dia) a cada contaminante elementar do ar, alimentos e água potável. Um peso corporal de 50 kg e um fator de segurança são utilizados para calcular o PDE.
Fonte: General Chapter 2232 USP, 2017.

No Brasil, somente os suplementos com registro obrigatório, devem apresentar laudo de análise de contaminantes inorgânicos de acordo com o Decreto Lei nº 55871/1965 (BRASIL,

1965; BRASIL 2016e). Os alimentos isentos de registro, ou seja, os alimentos para atletas e suplementos vitamínicos e/ou minerais, não precisam tal comprovação. Entretanto, a maioria dos suplementos comercializados no país é vendida nestas categorias, sem apresentar análise da contaminação, colocando em risco a saúde do consumidor.

2.3 IMPUREZAS ELEMENTARES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Incidentes com suplementos alimentares têm sido descritos, principalmente relatos quanto aos efeitos secundários inerentes aos próprios componentes da formulação e interação destes com medicamentos. Também podem ser citados casos associados à contaminações com metais pesados, dioxinas, microrganismos, e ainda adulterações com fármacos adicionados intencionalmente, como forma de garantir o efeito anunciado no rótulo (CAMPOS; OLIVEIRA, 2012).

Inúmeras técnicas analíticas e abordagens experimentais podem ser usadas para identificar e medir metais e metaloides, a fim de obter resultados confiáveis e avaliações corretas no campo da análise de suplementos alimentares. A seleção de uma técnica para análise elementar neste tipo de amostra dependerá de vários fatores como, o elemento que se deseja determinar, concentração do elemento na amostra, capacidade de detecção, interferências analíticas, precisão, faixa linear, custo e manutenção do instrumento (SMICHOWSKI; LONDONIO, 2018).

Uma das técnicas mais utilizadas para determinação de elementos inorgânicos em suplementos alimentares é a ICP-MS. Szok e colaboradores (2015) analisaram Cd e Pb em suplementos dietéticos através de ICP-MS. Os resultados demonstraram que teores de Cd e Pb variam de acordo com a região de produção. Uma das amostras apresentou níveis de 9,27 µg/g de Pb, resultado acima do permitido pela Comissão Europeia para estes produtos (3,00 µg/g). Os metais tóxicos como Pb e Cd, podem ocorrer nas plantas devido, a adversidades do ambiente, atividade biológica da planta e fontes antropogênicas como produtos agrícolas e industriais (SZOK; KURZAWA; SZLYK, 2015).

O chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo, a toxicidade do chumbo gera desde efeitos claros, ou clínicos, até efeitos sutis, ou bioquímicos. O chumbo afeta vários órgãos e sistemas, sendo que as alterações celulares e os efeitos neurológicos sobre o desenvolvimento parecem ser os mais críticos. Esse metal produz efeitos sobre muitos processos bioquímicos; em particular, afeta a síntese da heme, o sistema

hematopoiético e a homeostase do cálcio, interferindo em outros processos celulares (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A exposição ao cádmio produz uma extensa variedade de efeitos adversos envolvendo muitos órgãos e sistemas. Do ponto de vista da medicina preventiva, a detecção de efeitos adversos nos rins é de fundamental importância, a fim de impedir efeitos mais sérios nos pulmões ou nos ossos. Uma consequência da disfunção tubular renal é o distúrbio do metabolismo do cálcio e da vitamina D. De acordo com alguns estudos, isto pode levar a danos na calcificação óssea (MUNIZ; FILHO, 2006).

Hedegaar e colaboradores (2013) analisaram a presença de arsênio em suplementos dietéticos à base de ervas, de origem chinesa e dinamarquesa. O teor de arsênio inorgânico foi determinado em 16 suplementos dietéticos, por ICP-MS e Cromatografia Líquida de alta eficiência com espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (*High Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, HPLC-ICP-MS). Os resultados obtidos foram de 0,03 a 3,2 mg/kg de arsênio inorgânico, de acordo com a Farmacopeia Americana apenas um suplemento excedia o limite de arsênio (1,5 mg/kg para componentes individuais) (HEDEGAAR; ROKKJAER; SLOTH, 2013).

A exposição ao As em longo prazo pode causar aterosclerose, hipertensão, doenças isquêmicas do coração e arritmias. A exposição crônica ao As pode induzir o estresse oxidativo, levando ao aumento da pressão arterial (SINGH; GOEL; KAUR, 2011). Uma vez introduzido no organismo, o As é distribuído para todos os tecidos ou órgãos ricos em compostos com grupamentos sulfidrilas, sendo facilmente detectável em elevadas concentrações na pele, unhas e cabelos (SOUZA et al., 2015; FOWLER et al., 2007).

Moreta e colaboradores determinaram arsênio, mercúrio, chumbo e cádmio em 32 suplementos de creatina por ICP-MS. Apenas o Hg apresentou limites quantificáveis em 24 amostras, os outros elementos estavam em concentrações abaixo do limite de detecção. Nenhuma das amostras que continham Hg apresentava concentração acima da legislação europeia (MORETA; PREVARIN; TUBARO, 2011).

Outro estudo de Marrero e colaboradores determinou 15 elementos em suplementos alimentares comercializados na Argentina e nos Estados Unidos. Os elementos foram determinados por ICP OES (Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente do inglês *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*). Os elementos chumbo, cádmio, arsênio e mercúrio, não foram quantificados nas 5 amostras analisadas, as concentrações foram menores que as limite de detecção (MARRERO et al., 2013).

Krawczyk (2014) determinou elementos traços em suplementos multivitamínicos por HR-CS GFAAS, as amostras foram analisadas na forma de pasta, após serem digeridas com ácido nítrico. As concentrações dos elementos nas amostras analisadas foram 0,0001 a 0,002 mg As/comprimido, 0,0004 a 0,002 mg Cd/comprimido e 0,004 a 0,008 mg Pb/comprimido.

Existem poucos estudos que analisaram a presença de contaminantes inorgânicos em *dietary supplements*, tão poucos em alimentos para atletas e suplementos comercializados no Brasil. Além disso, a maioria das técnicas empregadas necessita digerir as amostras, aumentando as chances de ocorrer contaminações cruzadas e tornando o processo de análise mais lento.

2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

O princípio desta técnica se baseia na absorção de radiação eletromagnética de frequência específica por átomos livres no estado gasoso. O átomo, no estado fundamental, absorve quantidade específica de energia, ou seja, uma radiação de frequência definida, emitida por uma fonte de radiação, sendo assim excitado. A atenuação da intensidade de radiação emitida pela fonte é proporcional à quantidade de analito presente, sendo utilizada para quantificar o analito (WELZ, 1999).

Quando utiliza uma fonte de radiação específica a técnica é denominada espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS). A LS AAS utiliza lâmpadas de cátodo oco, as quais emitem radiação específica para cada elemento, tornando a técnica altamente seletiva e dispensando o uso de monocromadores de alta resolução (BORGES; CURTIUS; WELZ, 2005). Apesar dessas vantagens a técnica apresenta diversas limitações, entre elas a análise monoelementar, dificultando a determinação de diversos elementos devido à necessidade de ter uma lâmpada para cada elemento, e principalmente, devido à falta de informação obtida na região da análise; como uma estreita faixa do espectro é utilizada na análise se obtém uma limitada informação da região espectral (WELZ, 1999; BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2003).

A espectrometria de absorção atômica de alta resolução utilizando fonte contínua é composta por uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, formada por dois eletrodos de tungstênio, operando em modo *hot spot*, a partir da qual é emitida uma radiação de alta intensidade e na faixa da região do UV-visível. A radiação emitida ao passar pelo atomizador chega a um monocromador duplo de alta resolução, constituído por um prisma pré-dispersor, com a função de separar o espectro da radiação incidente, na região de interesse, e também uma

rede de difração Echelle, sendo responsável pela alta resolução do intervalo selecionado. Por fim, a radiação emitida, transmitida e selecionada atinge o detector. Este é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) contendo 512 pixels fotossensíveis independentes, dos quais 200 são destinados a fins analíticos, permitindo a visualização de 200 a 500 pm da região espectral na qual está contida a linha analítica (BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2003).

Assim, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, possui vantagens quando comparada com a tradicional, como por exemplo, a alta intensidade, o que oferece à técnica limites de detecção menores devido a uma maior razão sinal/ruído; visualização de todo o ambiente espectral no qual a linha analítica está contida, permitindo, assim a melhor correção de fundo e principalmente um avançado e eficiente sistema de correção de fundo (WELZ, 1999; BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2003).

Diferentes atomizadores podem ser empregados para obter átomos no estado fundamental, por isso a técnica de espectrometria de absorção atômica pode ser subdividida de acordo com o tipo de atomizador utilizado: (I) a FAAS (do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), na qual a amostra é convertida em um aerossol no nebulizador para ser então transportada para o atomizador que é a própria chama; (II) a GFAAS (do inglês *Grafite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) onde é utilizado um forno de grafite como atomizador; e (III) o HGAAS (do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*) que se baseia na conversão do analito à seu hidreto volátil no atomizador, que pode ser fornos de grafite ou tubos de quartzo (WELZ et al., 2003).

2.4.1 Análise direta de sólidos por Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (HR-CS GFAAS)

A técnica GF AAS é muito empregada para a determinação de baixas concentrações de elementos em matrizes diversas, pois apresenta alta sensibilidade e seletividade necessitando de reduzido volume de amostra, além de possibilitar amostragem direta. Apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas como a FAAS e ICP OES, pois além da eliminação da matriz nas etapas de aquecimento (secagem e pirólise), o tempo de residência do analito durante a atomização é maior, isto torna a técnica menos sujeita aos efeitos do tamanho e da volatilidade das partículas e confere uma maior sensibilidade (WELZ; SPERLING, 1999).

A maioria das amostras submetidas para a determinação elementar por GF AAS encontra-se na forma sólida. Usualmente, as amostras são convertidas em soluções aquosas por

meio de procedimentos por via seca ou por via úmida (KINGSTON; HASWELL, 1997). Esses procedimentos apresentam características favoráveis e limitações que dependem do tipo de amostra, dos analitos e de suas concentrações. Erros sistemáticos devido à contaminação ou perdas por volatilização estão entre os mais frequentes, podendo afetar diretamente a exatidão e a precisão dos resultados analíticos. Considerando que a GF AAS é uma técnica destinada à determinação de traços e ultratraços de elementos, os cuidados no preparo das amostras tornam-se cruciais para o sucesso do método empregado (WELZ; SPERLING, 1999; JACKSON, 1999; KURFUST, 1998). Desta forma, a determinação elementar a partir da análise direta da amostra sólida, com o mínimo de manipulação se torna uma alternativa adequada e recomendada.

Na análise direta de sólidos por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (HR-CS GFAAS, do inglês *direct solid sampling with graphite furnace atomic absorption spectrometry*) as amostras podem ser introduzidas de duas maneiras, na forma de suspensão e na forma direta de sólido. A escolha da forma de introdução de amostra sólida depende do tipo de amostra a ser analisada (BENDICHO; LOOS-VOLLEBREGT, 1991). Para a análise direta, a amostra é pesada e introduzida no atomizador, sem a necessidade de tratamento prévio. As vantagens da análise direta da amostra sólida são: simplificação no tratamento da amostra; minimização dos riscos de contaminação devido ao uso de quantidades reduzidas de reagentes; minimização das perdas do analito de interesse; não utilização de reagentes tóxicos ou corrosivos; minimização de geração de resíduos; maior detectabilidade, uma vez que as amostras não são diluídas; e possibilidade de analisar uma pequena quantidade de amostra (KURFUST, 1998; BENDICHO; LOOS-VOLLEBREGT, 1991).

Em amostragem direta de sólidos desvios da ordem de 5 a 10% são aceitáveis para elementos presentes em ug/g, enquanto que desvios entre 10 a 30% são aceitáveis para níveis de ng/g (LANGMYHR, 1985). Geralmente altos desvios são atribuídos à baixa homogeneidade da amostra. Amostras sólidas que naturalmente são heterogêneas, pequenas quantidades tendem a comprometer a representatividade em determinações de baixas concentrações. A homogeneidade é uma característica particular do tipo de amostra e depende da quantidade de analito presente, bem como de sua distribuição no material sólido. Neste contexto, torna-se então necessário estabelecer as menores massas representativas capazes de serem analisadas sem comprometer a precisão e exatidão dos resultados (PAUWELS, et al., 1994).

Em decorrência da falta de informações provindas das propriedades da amostra, Kurfüst e colaboradores, introduziram na década de 80, o conceito de fator de homogeneidade (He), o qual busca caracterizar amostras sólidas quanto à homogeneidade para pequenas massas de

amostras, se tornando mais uma ferramenta útil à análise direta de sólidos (KURFUST et al., 1993). O qual pode ser calculado segundo a equação 1:

$$H_e = S_H \sqrt{m}$$

onde, S_H = desvio padrão relativo de todas as medidas e m =massa média.

A homogeneidade de um material pode ser determinada através dos erros de amostragem (S_H) de uma massa m (mg). Considerando que a massa normalmente empregada é em torno de 1 mg, H_e corresponde ao erro de amostragem para 1 mg de massa, sendo que valores de H_e menores que 10 indicam um material homogêneo. Segundo Kurfürst, sob determinadas condições, em que o procedimento analítico é relativamente livre de outras fontes de erros, esta equação pode ser aplicada com certa confiança para estimar a homogeneidade em uma larga escala de amostras (KURFÜRST, 1998).

Apesar das vantagens características da amostragem direta de sólidos, a calibração sempre foi considerada problemática, pois o processo de atomização do analito depende da forma na qual o analito se encontra na amostra sólida e o quanto este processo pode ser influenciado pela matriz (BELARRA; RESANO; VANHAECKE, 2002; KNAPP, 1991). Na GFAAS são usados três tipos de calibração: adição de padrão, calibração com materiais de referência certificados e calibração com soluções de referência (BELARRA et al., 1999). Na adição de padrão pode-se manter constante a massa da amostra e variar a concentração das soluções de referência, no entanto há dificuldade na pesagem e transferência de massas idênticas.

Muito autores relatam que a utilização de materiais de referência certificados (CRMs) é a forma de calibração mais apropriada para a amostragem direta de sólidos na espectrometria de absorção atômica (BELARRA et al., 1999; KNAPP, 1991; SÉBY et al., 2003). O seu uso permite compensar os efeitos da matriz, desde que as amostras e o CRM sejam afetados da mesma maneira. Para isso, devem possuir matriz e concentração do analito semelhantes (KNAPP, 1991). Entretanto, além de não existir para todos os tipos de amostras sólidas, os CRMs são relativamente caros devido à complexidade da sua produção.

Em relação aos métodos citados anteriormente, as soluções de referência para calibração possui as vantagens de serem facilmente disponíveis, terem menor custo, além da calibração ser mais rápida e fácil de executar. Através da integração do sinal analítico e adequado controle das temperaturas de atomização ou vaporização do analito resultados exatos podem ser obtidos (BELARRA; RESANO; VANHAECKE, 2002).

Para avaliar se a técnica de calibração aquosa pode fornecer resultados exatos e precisos, estudos demonstraram que a massa característica é um bom indicativo. Para isso, a massa característica do analito na solução de referência e na amostra deve possuir a mesma magnitude. Quando a massa característica do analito na solução de referência for diferente daquela do analito na amostra, os efeitos da matriz podem ser mais pronunciados (BELARRA; RESANO; VANHAECKE, 2002; DONG; KRIVAN, 2001; KURFURST, 1998).

Mesmo ocorrendo etapas distintas no programa de temperatura a fim de proporcionar as melhores condições para a determinação do analito, podem ocorrer perdas de analito na etapa de pirólise. Com a finalidade de aumentar a estabilidade térmica do analito e/ou ainda a eficiência da etapa de pirólise são utilizadas substâncias denominadas modificadores químicos. O modificador químico pode atuar de duas formas: combinando-se com o analito, aumentando sua estabilidade térmica ou combinando-se com a matriz e aumentando a sua volatilidade (WELZ; SPERLING, 1999; FROES; WINDMÖLLER; DA SILVA, 2003).

Os elementos utilizados como modificadores químicos são geralmente metais e devem apresentar as seguintes características: estabilizar o analito a pelo menos 1000°C para garantir a total eliminação da matriz na etapa de pirólise; não diminuir a vida útil do tubo de grafite; estar disponível em alto grau de pureza para evitar contaminações; ser raramente determinado por GF AAS; não afetar negativamente a sensibilidade da técnica; não contribuir para a absorção de fundo; os limites de detecção não devem ser aumentados pelo uso do modificador; e deve possibilitar a aplicação a uma ampla variedade de matrizes (WELZ; SPERLING, 1999; FROES; WINDMÖLLER; DA SILVA, 2003).

Existem dois tipos de modificadores químicos: os modificadores químicos convencionais e os modificadores químicos permanentes. Os modificadores químicos convencionais são inseridos simultaneamente com a amostra na plataforma, no caso de análise de sólidos. Uma vez que a quantidade de amostra inscrita é limitada, também podem ser previamente secos na plataforma, antes da inserção da amostra no atomizador. A mistura de nitratos de paládio e magnésio (Pd/Mg) em solução é conhecida como o “modificador universal”, pois atua eficazmente para um amplo número de analitos e em diversas matrizes (SCHLEMMER; WELZ, 1986).

Já os modificadores permanentes são soluções que fazem o recobrimento da superfície da plataforma, ou da parede do forno de grafite, quando submetidas a um tratamento térmico. Este recobrimento possui a vantagem de permanecer por várias queimas subsequentes, podendo até chegar ao final da vida útil do tubo sem precisar de uma nova aplicação. São muito utilizados os elementos do grupo da platina como irídio, rutênio e o ródio que são elementos formadores

de óxidos, e também elementos formadores de carbetos zircônio, tungstênio, nióbio e tântalo. Combinações de modificadores que formam carbetos e óxidos como tungstênio/ródio, tungstênio/irídio e tungstênio/rutênio também são aplicadas. Os modificadores permanentes apresentam algumas vantagens sobre os modificadores convencionais, uma vez que podem aumentar consideravelmente a vida útil do forno e diminuir os valores de brancos (WELZ; SPERLING, 1999).

2.4.2 Espectrometria de Absorção Atômica de Geração de Hidretos (HGAAS)

A geração de hidretos se baseia no princípio de que alguns elementos podem gerar hidretos voláteis (As, Bi, Ge, Pb, Sb, Sn, Se, Te) na presença de um ácido com um agente redutor forte (HOLAK, 1969). Hidretos são íons negativos de hidrogênio, existem várias classes conhecidas, sendo a mais conhecida os covalentes como os de arsênio, selênio, estanho e chumbo, todos gasosos à temperatura ambiente (HURD, 1952).

A geração de hidretos envolve a conversão do analito presente na amostra líquida em um composto volátil através de uma reação com um agente redutor. Após a separação do hidreto volátil na solução em um separador gás-líquido, ele é transferido com o auxílio de um gás carreador para uma cela de atomização, sendo posteriormente detectado o elemento correspondente.

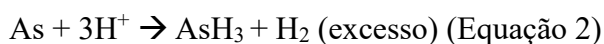
Comumente, como agente redutor para a geração hidreto são utilizados sais de tetrahidroborato, como o de sódio (NaBH_4), em meio ácido. O uso do NaBH_4 como redutor diminui o sinal do branco, garante a obtenção de sinais reprodutíveis e diminui o tempo de reação, devido a sua elevada reatividade. Contudo, por ser instável, a solução do redutor deve ser preparada e utilizada dentro de algumas horas. A solução de NaBH_4 é preparada em meio alcalino, geralmente contendo NaOH de 0,05 a 2% (m/v), para aumentar a estabilidade e prevenir sua decomposição (LEE, 1996; DEDINA; TSALEV, 1995).

O mecanismo envolvido na reação de geração do hidreto é complexo. O hidreto é gerado a partir da transferência do hidrogênio ligado diretamente ao boro. Isso ocorre pela formação de complexo intermediário entre o analito e o tetrahidroborato, confirmado experimentalmente pelo uso de reagentes deuterados (D'ULIVO et al., 2007; D'ULIVO, 2010).

As principais variáveis químicas avaliadas na geração dos hidretos são concentração e tipo de ácido e a concentração do redutor (NaBH_4), elas interferem diretamente na sensibilidade do método (ANAWAR, 2012).

As principais vantagens associadas à geração de hidretos são a separação do analito da matriz, a elevada eficiência do transporte do analito para o atomizador, a melhor sensibilidade e melhores limites de detecção em comparação com a nebulização pneumática. No entanto, a técnica possui algumas limitações uma vez que a presença de constituintes da amostra, o pH e concentrações dos reagentes podem interferir na geração do hidreto (DEDINA; TSALEV, 1995; TAKASE et al., 2002). Outra questão importante é que a eficiência da geração de hidretos pode ser diferente para cada espécie, dependendo do estado de oxidação da espécie. Isso pode ser contornado através do uso de agentes oxidantes (como o H_2O_2) ou através de uma etapa prévia de redução do analito por ácido ascórbico/iodeto de potássio ou L-cisteína (PETURSDOTTIR et al., 2014; DEDINA; TSALEV, 1995).

A HG AAS (do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*) é a técnica mais utilizada para a determinação de arsênio, por ser relativamente simples, de baixo custo operacional e possuir boa sensibilidade (HENDEL et al., 2011). O sistema de geração de hidretos de arsênio pode ser classificado em 4 etapas: (I) Geração dos hidretos (equação 1 e 2), através de um agente redutor em meio ácido, promovendo a formação de AsH_3 (arsina); (II) separação (através de um separador gás-líquido); (III) transporte até o atomizador, através de um gás de arraste inerte (como nitrogênio ou argônio); (IV) atomização (equação 3). Que pode ocorrer em um tubo de quartzo aquecido eletricamente, ou por um chama de ar/acetileno, com temperaturas em torno de 800-1000 °C. Após o aquecimento, acontece a decomposição da arsina pela temperatura e pelas colisões com radicais hidrogênio (H°), isso gera átomos livres em fase gasosa no estado elementar, estes vão absorver a radiação eletromagnética que futuramente irá gerar o sinal analítico (CARRERO et al., 2001; DEDINA; TSALEV, 1995; FENG et al., 1998).



O acoplamento HGAAS apresenta menos interferências que a técnica de espectrometria de absorção atômica convencional, já que acontece a separação das espécies de interesse na forma de hidretos. Apesar de apresentar menos interferências, ainda podem ocorrer algumas, principalmente na fase líquida, durante a formação ou transferência do hidreto da solução (RASMUSSEN et al., 2012), interferentes podem afetar a eficiência da geração do hidreto

devido à competição pelo agente redutor e também pode acontecer precipitação ou co-precipitação da espécie de interesse (WELZ; MELCHER, 1984). As interferências ocorrem de várias maneiras, pode haver reação de outros elementos contaminantes que gerem hidreto com o agente redutor, ainda pode ocorrer reações simultâneas entre o interferente e o redutor (RASMUSSEN et al., 2012). Altas concentrações de HCl podem reduzir as interferências da fase líquida por metais de transição (DEDINA; TSALEV, 1995).

Ainda podem ocorrer interferências na fase gasosa, estas são ocasionadas por espécies voláteis, que na sua maioria também são formadoras de hidretos. Estas podem interferir durante o transporte do hidreto, tornando o lugar do analito durante a passagem do mesmo até o atomizador, diminuindo a eficiência na atomização e atrasando a coleta do sinal analítico. Em menor escala, o mercúrio, também pode causar interferências na fase gasosa, competindo pelos radicais hidrogênio na célula de atomização (WELZ; MELCHER, 1984).

Um tubo de quartzo pode eliminar alguns interferentes espectrais e não espectrais da fase gasosa devido a elevada eficiência de transporte. Entretanto, ainda podem ocorrer limitações devido a presença da matriz durante a reação de formação, liberação e atomização do hidreto (STRIPEIKIS et al., 2001).

3. METODOLOGIA

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todas as medidas realizadas para a determinação de Cd e Pb foram conduzidas em um espectrômetro de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (AnalytikJena®, Alemanha), equipado com amostrador sólido automático SSA600. A fonte de emissão é composta de uma lâmpada de arco curto de xenônio (GLE, Berlim, Alemanha), operando em modo “*hot-spot*”. O sistema inclui um duplo monocromador composto de um prisma como pré-monocromador associado a um monocromador de alta resolução com rede de *echelle*. O detector CCD possui 588 *pixels*, sendo 200 deles usados com finalidade analítica e o restante utilizado para correções internas do equipamento. As linhas analíticas utilizadas foram 283,3060 e 228,8018 nm, para o Pb e o Cd respectivamente. A quantificação do sinal analítico foi realizada através da medida de absorvência proveniente da área do pico, considerando dois ou três pixels adjacentes ($CP \pm 1$). O atomizador utilizado foi o forno de grafite aquecido transversalmente para análise direta de sólidos sem o orifício dosador (Analytik Jena, Jena, Alemanha). O gás argônio utilizado como gás de proteção e purga possui pureza 99,999%. Os fornos e as plataformas para análise de sólidos utilizadas foram recobertos piroliticamente. As plataformas foram inseridas ao forno de grafite através do amostrador sólido automático (AnalytikJena, Jena, Alemanha, SSA 600), a qual possui uma microbalança com precisão de 0,001 mg.

As medidas de As foram realizadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica novaA 300 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), equipado com gerador de hidretos HS60 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) e amostrador automático modelo As52S (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Uma célula de quartzo aquecida a 920 °C foi utilizada como atomizador. A fonte de radiação foi uma lâmpada de cátodo oco de As operando com uma corrente de 10 mA. A absorvência do As foi medida em 193,7 nm, sendo a abertura da fenda do monocromador 0,8 nm e o tempo de integração do sinal 40 s.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω /cm) foi obtida usando um sistema de destilação/deionização seguida de

Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todas as soluções foram estocadas em tubos de polietileno previamente descontaminados.

As soluções estoques individuais de Pb, Cd e As foram preparadas em 0,1% (v/v) de HNO₃ destilado, através da diluição de uma solução padrão de 1000 mg/L (Sepcsol, USA). Os modificadores de nitrato de magnésio (Mg(NO₃)₂) e nitrato de paládio (Pd(NO₃)₂) foram preparados na concentração de 1 g/L. O volume utilizado do modificador foi de 3 µL Pd(NO₃)₂ e 2 µL Mg(NO₃)₂ para determinação de Pb e 5 µL Pd(NO₃)₂ para determinação de Cd. A solução de zircônio 0,5 g/L foi preparada a partir de Cloreto de Zircônio (Merk).

O material de referência certificado SRM 3260 (Bitter Orange-Containing Solid Oral Form) fornecido pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), Gaithersburg, EUA foi utilizado para avaliar a exatidão do método desenvolvido para determinação de Pb.

3.3 PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO

Todos os frascos plásticos utilizados foram lavados com água corrente, em seguida enxaguados com água deionizada e imersos em solução 10% de HNO₃ (v/v) em etanol diluído (50% etanol e 50% água) por 48 horas. Na vidraria utilizada foi colocada solução de HNO₃ 1% (v/v) em água por 48 horas. Na sequência, a vidraria foi lavada com água ultrapura abundantemente. O HNO₃ utilizado foi destilado em um destilador de ácidos, para reduzir a sua contaminação por metais e impurezas.

3.4 AMOSTRAS

De acordo com o orçamento disponível para o desenvolvimento do presente trabalho, foi possível a aquisição de 72 amostras de suplementos alimentares. As amostras foram adquiridas no período de 2015 a 2016, através da inserção de palavra-chave como “suplementos alimentares”, “suplementos emagrecedores” e “suplementos vitamínicos e minerais” na ferramenta de pesquisa Google. Todos os suplementos alimentares eram provenientes de *websites* brasileiros, a fim de demonstrar a facilidade de acesso a estes produtos por parte do consumidor brasileiro.

As formulações adquiridas foram analisadas e classificadas de acordo com o país de procedência, composição declarada pelo fabricante (material vegetal, nutrientes, aminoácidos e outros aditivos) e de acordo com a classificação do produto segundo a legislação brasileira. Por razões legais o nome das amostras, independentemente do resultado, não será divulgado,

procedendo-se assim à codificação do nome das amostras (A1- A72). No quadro 3 encontram-se descritas as características das 72 amostras que foram analisadas durante este trabalho.

Quadro 3- Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continua)

Amostra	Forma Farmacêutica	País de origem	Ingredientes declarados	Posologia/Modo de usar	Situação do Registro na ANVISA
A1	Cápsula	Brasil	Guaraná, chá mate, mix de vitaminas e minerais (cálcio, colina, cromo, niacina, ácido pantotênico, vitamina B2 e vitamina B1)	4 cápsulas por dia	Registro da Anvisa/MS 493770077
A2	Cápsula	Brasil	Guaraná em pó, dióxido de silício	2 cápsulas por dia	-
A3	Pó a granel	Brasil	Maltodextrina, fenilalanina	40 g de pó em 250 mL de água	-
A4	Pó a granel	EUA	Maltodextrina, guaraná, laranja amarga, chá verde, cromo, niacina, vitamina C	4 g em 250 mL, 2 vezes ao dia	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A5	Cápsula	Brasil	Extrato de acerola, extrato de café verde, extrato de chá verde, extrato de <i>Goji berry</i> , vitamina C, vitamina A, vitamina E, picolinato de cromo, quelato de selênio, quelato de zinco	1 cápsula, 2 vezes ao dia	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A6	Cápsula	Brasil	Extrato de acerola, café verde, picolinato de cromo, vitamina C, amido de milho, vitamina A, vitamina E, quelato de selênio, quelato de zinco	2 cápsulas, 2 vezes ao dia	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A7	Cápsula	Brasil	Caféina anidra	1 cápsula por dia	Registro da Anvisa/MS 625750032001-1
	Cápsula	Brasil	Fibra de laranja, <i>Psillium</i> , quitosana enriquecido com vitaminas e minerais.	2 cápsulas, 2 vezes ao dia	
A8	Pó a granel	Brasil	Proteína isolada, chocolate gourmet, amido de milho ceroso	30 g em 250 mL de água, 2 vezes ao dia	-
A9	Pó a granel	EUA	Proteína hidrolisada e isolada, cacau em pó, lecitina de soja.	4 doses de 25 g em 125 mL de água	*

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

Quadro 2 - Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continuação)

A10	Pó a granel	Estados Unidos	Proteína do soro de leite isolada e hidrolisada. cacau, sal, cloreto de potássio, sucralose.	31 g em 300 mL de água	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A11	Comprimido	Brasil	Cafeína 220 mg	1 comprimido/ dia	-
A12	Cápsula	Estados Unidos	Guaraná, colina, <i>Psyllium</i> , vitaminas	2 cápsulas, 2 vezes ao dia	Registro da Anvisa/MS 509690131001-1
A13	Cápsula	Brasil	Maltodextrina, colina, magnésio, vitaminas, cromo, ácido fólico, extrato de chá verde, extrato de guaraná, extrato de laranja amarga, extrato de canela	2 cápsulas, 2 vezes ao dia	-
A14	Cápsula	Estados Unidos	Cafeína	1 cápsula 1 x ao dia	*
A15	Cápsula	Brasil	Quitosana, <i>Psyllium</i> , farelo de aveia	2 cápsula, 2 vezes ao dia	Registro da Anvisa/MS 621660018001-0
A16	Cápsula	Brasil	Guaraná em pó, citrus, café verde, picolinato de cromo,	4 cápsulas ao dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A17	Cápsula	Brasil	<i>Psyllium</i> , abacaxi, acerola, açaí, amora, ameixa, banana, laranja, maçã, mamão, morango, maracujá, tamarindo, uva, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, espinafre, tomate, guaraná, cogumelo <i>Agaricus blazei</i> , gérmen de soja, aveia, trigo, linhaça, gergelim, cacau, alho	2 a 3 cápsulas ao dia	Registro da Anvisa/MS 666600015001-4

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

Quadro 2 - Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continuação)

A18	Cápsula	Brasil	L-valina, L-leucitina, L-isoleucina, vitamina B6, arginina	4 cápsulas ao dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A19	Cápsula	Brasil	Cromo, colina, cálcio, silício, zinco, magnésio, café verde, vit. C, vit. B3, ácido fólico	3 cápsulas ao dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A20	Pó a granel	Brasil	Chá verde, colágeno, inulina, gengibre, vitaminas e minerais	5 g em 200 mL de água após as refeições	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A21	Comprimido	Estados Unidos	Cafeína, fosfato dicálcico, dióxido de silício, chá verde, leucina, tirosina, extrato de casca de pinheiro, garcinia	4 comprimidos por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A22	Pó a granel	Brasil	Colágeno, betacaroteno, vitamina C	10 g em 200 mL	-
A23	Cápsula	Brasil	fibra de laranja amarga	2 cápsulas, 2 vezes ao dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A24	Cápsula	Estados Unidos	Cafeína anidra	2 cápsulas, 2 vezes ao dia	*
A25	Cápsula	Estados Unidos	Cafeína anidra	2 cápsulas, 2 vezes ao dia	*
A26	Pó a granel	Brasil	Triglicerídeos de cadeia média	10 g em 150 mL de líquido	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A27	Cápsula	Brasil	Aminopolissacarídeo	2 cápsulas, 3 vezes ao dia	663270014001-7
A28	Pó a granel	Brasil	Proteína do soro do leite, albumina, caseína, L-leucina, L-valina, L-isoleucina	24,7 g em 300 mL de água	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A29	Sachê em pó	Brasil	Chá branco, colágeno, <i>Phaseolus vulgaris</i> , cromo	5 g em 200 mL de água	RDC n° 278/2005

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

Quadro 2 - Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continuação)

A30	Comprimido	Brasil	Cafeína anidra	2 comprimidos por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A31	Cápsula	Brasil	Cafeína anidra	1 cápsula por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A32	Cápsula	Brasil	Cafeína anidra	2 cápsulas por dia	-
A33	Pó a granel	Estados Unidos	Proteína do soro de leite isolada, peptídeos do soro do leite	32 g em 300 mL de água ou leite por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A34	Pó a granel	Brasil	Glutamina	5g em 60 mL de água junto com as refeições	Registro da Anvisa/MS 626620010001-5
A35	Cápsula	Brasil	Cafeína anidra	2 cápsulas ao dia	RDC n° 18/2010
A36	Pó a granel	Brasil	Triglicerídeos de cadeia média	10 g em 200 mL	-
A37	Cápsula	Brasil	<i>Citrus aurantium</i> , chá verde colina, cromo, magnésio, vitamina B3 e B6, vitamina C e ácido fólico	4 cápsulas ao dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A38	Pó a granel	Brasil	Chá verde, laranja amarga, guaraná, vitaminas e minerais	1 sachê em 300 mL de água antes das refeições	Registro da Anvisa/MS 605426-4
A39	Cápsula	Brasil	Colina, cromo, magnésio e <i>Citrus aurantium</i>	2 cápsulas ao dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A40	Pó a granel	Brasil	Aminoácidos de cadeia ramificada	13,37g em 350 mL por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

Quadro 2 - Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continuação)

A41	Pó a granel	Brasil	Proteína de carne bovina hidrolisada e isolada, maltodextrina	31,3 g em 200-300 mL de água por dia	-
A42	Pó a granel	Brasil	Cafeína, taurina, chá verde, <i>Citrus aurantium</i> , gengibre e pimenta vermelha	12 g em 200 mL de água por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A43	Cápsula	Brasil	Quitosana	3 cápsulas, 2 vezes por dia	648450024
A44	Cápsula	Brasil	Creatina, arginina, extrato de guaraná com alto teor de cafeína	abaixo de 70 kg: 8 cápsulas ao dia, entre 70 e 90 kg: 9 cápsulas ao dia, acima de 90 kg: 10 cápsulas ao dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A45	Pó a granel	Brasil	Dextrose, maltodextrina, creatina, guaraná, cálcio arginina quelato, cálcio ornitina quelato, taurina	15 g e 200 mL de água e consumir 45 min antes do treino	RDC n° 18/2010
A46	Cápsula	Brasil	Carnitina	1 a 2 cápsulas por dia	Registro da Anvisa/MS 621660107001-3
A47	Cápsula	Brasil	Cafeína anidra	1 a 2 cápsulas ao dia antes do treino	RDC n° 18/2010
A48	Pó a granel	Brasil	Maltodextrina, soro de leite, leite em pó desnatado, proteína isolada de soja, fibra de aveia, vitaminas e minerais, ácido pantotênico, óleo vegetal de coco em pó	3 1/2 colheres de sopa em 250 ml de leite desnatado	-
A49	Cápsula	Brasil	Cafeína 420 mg	1 cápsulas ao dia antes do treino	Dispensado pela RDC n° 27/2010

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

Quadro 2 - Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continuação)

A50	Comprimido	Estados Unidos	Cafeína 420 mg	1 comprimido ao dia	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A51	Cápsula	Estados Unidos	Cafeína 420 mg	2 cápsulas ao dia	*
A52	Cápsula	Brasil	L-carnitina	1 cápsula por dia	Registro da Anvisa/MS 655700027001-4
A53	Cápsula	Brasil	Cafeína anidra 300 mg	1 cápsula por dia	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A54	Cápsula	Brasil	Vitamina B1, vitamina B2, vitamina C, Vitamina B5, Vitamina B3, vitamina B9, vitamina H, vitamina B12, picolinato de cromo, bitartarato de colina, extrato de guaraná, chá verde	4 cápsulas por dia	Registro da Anvisa/MS 655700014001-3
A55	Pó a granel	Brasil	Taurina, cafeína, picolinato de cromo, guaraná, laranja amarga, chá verde, café verde	5g em 200 mL de água por dia	-
A56	Cápsula	Brasil	<i>Psyllium</i> (plantago ovate)	2 cápsulas, 3 vezes ao dia	Registro da Anvisa/MS 623580078001-7
A57	Cápsula	Brasil	Guaraná, citrato de colina, cromo, nicotinamida, pantenoato de cálcio, tiamina	4 cápsulas, 1 vez por dia	Dispensado pela RDC nº 27/2010

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

Quadro 2 - Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continuação)

A58	Pó a granel	Brasil	Colágeno, polpa de frutas de <i>Bromelia ananás</i> L., flores de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., folhas de <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf, folhas e talos de <i>Ilex paraguariensis</i> , folhas de carqueja, folhas e talos de chá verde, folhas e talos de chá branco, óxido de magnésio, nicotinamida, maltodextrina, pantotenato de cálcio, cianocobalamina, picolinato de cromo, biotina	4 g em 400 mL de água por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A59	Comprimido	Brasil	Cafeína 220 mg	1 comprimido por dia, 30 min antes do treino	-
A60	Cápsula	Brasil	Cafeína anidra 210 mg	1 cápsula, 1 vez por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010
A61	Cápsula	Brasil	Quitosana, spirulina, acerola e biotina	7 cápsulas por dia	Registro da Anvisa/MS 653300007
A62	Cápsula	Brasil	Picolinato de cromo 200 mg	1 cápsula por dia	Registro da Anvisa/MS 655700016001-4
A63	Pó a granel	Brasil	Laranja amarga, guaraná, chá verde, erva mate, canela do ceilão, gengibre, abacaxi, framboesa, maltodextrina	5g em 240 ml de água	-
A64	Cápsula	Brasil	Maca peruana, acerola, vitamina E, vitamina A, zinco, picolinato de cromo, selênio	2 cápsulas por dia	Dispensado pela RDC n° 27/2010

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

Quadro 2 - Características das amostras de suplementos alimentares em estudo.

(continuação)

A65	Pó a granel	Estados Unidos	Proteína do leite concentrada, proteína de soro do leite isolada, albumina, leite desnatado, triglicerídeos de cadeia média, cloreto de sódio, caseinato de sódio, óleo de girassol, óleo de canola, caseína, cacau em pó com álcalis	32,144g com 1 copo de água	*
A66	Pó a granel	Estados Unidos	Mistura de proteínas do soro do leite, glicina, creme de leite vegetal, cacau	37,8 g em 200 mL de água fria	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A67	Pó a granel	Estados Unidos	Laranja amarga, beterraba, chá verde, mate, guaraná, feno grego, açafraão, alecrim	3g em 250 ml de água	*
A68	Cápsula	Brasil	Quitosana, composto de laranja, guaranpa, <i>Psyllium</i> , vitamina C, cromo	2 cápsulas antes do café da manhã, 2 cápsulas antes do almoço, 1 cápsulas antes do jantar	Registro da Anvisa/MS 649530020001-8
A69	Pó a granel	Brasil	Creatina, beta-alanina	5,6 g em 150 mL de água 30 min antes da atividade física	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A70	Cápsula	Estados Unidos	360 mg de cafeína por cápsula	1 cápsula ao dia de preferência em jejum	*
A71	Cápsula	Brasil	Vit. C e picolinato de cromo, aromatizantes naturais (chá verde, guaraná, laranja amarga, ginseng e gengibre)	2 cápsulas ao dia, 30 min antes da atividade física	Dispensado pela RDC nº 27/2010
A72	Cápsula	Brasil	Cafeína, carbonato de cálcio, maltodextrina, estearato de magnésio, dióxido de silício	3 cápsulas	-

- Não informado.

* Importado regulado pelo FDA;

Fonte: Autor.

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HGAAS

Para decomposição das amostras por digestão ácida foi pesado uma amostra representativa do peso médio, um comprimido, uma cápsula ou de 0,5 g a 1,0 g das amostras à granel. A massa pesada foi transferida para um frasco Kjeldahl, adicionado 4 mL de H₂SO₄ concentrado (95%) e levado para aquecimento em bloco digestor (100 °C). Foram adicionados 1,5 mL de H₂O₂ 30% toda vez que a solução apresentava coloração marrom ou preta. A adição de H₂O₂ foi realizada até obter-se uma mistura límpida. Para análise de As foi adicionado 2,0 mL de HCl à mistura após obter-se uma solução límpida, foi deixado por mais 24 horas no bloco digestor. Ao final da digestão, as amostras foram aferidas a 20 mL em tubos cônicos com água ultra pura. O controle foi um frasco Kjeldahl com todos os reagentes, porém sem a adição da amostra.

3.6 DETERMINAÇÃO DE Pb e Cd POR HR-CS SS GFAAS

A determinação de metais pesado Pb e Cd foi realizada em espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua equipado com atomizador de forno de grafite, lâmpada de arco curto de xenônio e o gás inerte foi o argônio ultrapuro.

A curva de calibração foi construída utilizando soluções padrão aquosas. A massa característica (m_0) é definida como a massa de analito necessária para produzir um sinal de absorvância integrada de 0,0044 s. A m_0 foi calculada por regra de três utilizando um dos padrões da curva de calibração.

Para escolher a melhor temperatura de pirólise e atomização, foram realizadas curvas de pirólise e atomização para as amostras do estudo, a utilização de modificadores foi testada de acordo com o elemento.

O comprimento de onda, modificador e o programa de temperatura estabelecido após a otimização dos métodos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CS GFAAS e programa de temperatura para a determinação de Pb e Cd após otimização.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Modificador	Pirólise (°C)	Atomização (°C)
Cd	228,8018	Pd(NO ₃) ₂	700	1700
Pb	283,3060	Pd(NO ₃) ₂ +Mg(NO ₃) ₂	1300	2100

Fonte: Autor.

3.7 DETERMINAÇÃO DE As POR HGAAS

Para a determinação do As foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica novAA 300 (Analytik Jena®, Jena, Alemanha), equipado com o gerador de hidretos HS60 e amostrador automático modelo As52S. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco mono elementar de arsênio (Photron®, Austrália). Para a medida do sinal de fundo foi utilizada uma fonte de deutério (Analytik Jena®, Jena, Germany). As condições do equipamento estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros de operação do equipamento HG AAS para a determinação de As.

Parâmetros	As
Comprimento de onda (nm)	193,7
Fenda (nm)	0,8
Corrente da lâmpada (mA)	10
Temperatura de célula de quartzo	920 °C
Agente Redutor	NaBH ₄ 0,8% (m/v) em NaOH 0,15%
Vazão da solução do agente redutor	1 mL/min
Gás de arraste	Nitrogênio

Fonte: Autor

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os métodos foram validados conforme os seguintes capítulos da Farmacopeia Americana: Capítulo <233> (USP, 2017 a), Capítulo <1225> (USP, 2017 b) e Capítulo <852> (USP, 2017 c). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, faixa de concentração, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão e precisão. Além disso, diferentes curvas analíticas preparadas em diferentes dias (n=3) foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA).

3.8.1 Especificidade

Sabendo-se que as técnicas de AAS são baseadas na absorção de radiação de um comprimento de onda, que é característico para cada elemento, emitido por uma lâmpada de cátodo oco monoelementar ou uma lâmpada de arco curto de xenônio, a especificidade das técnicas de AAS é muito alta. Para comprovar essa especificidade, foram adicionados 10 µg/L de todos os elementos em estudo à amostra.

3.8.2 Linearidade e faixa de concentração

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas confeccionadas automaticamente pela diluição de padrões aquosos de cada elemento. Os resultados foram usados para obter uma equação linear usando o método dos mínimos quadrados, no software Excel. A comprovação da linearidade foi dada através do coeficiente de correlação (r).

As faixas de concentração testada para os elementos em estudo foram de 0-400 µg/L para o Pb e 0-20 µg/L para o As e Cd.

3.8.3 Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram obtidos através do método do branco. Desta forma, o branco (obtido no Item 3.5 para a determinação de As e para determinação de Cd e Pb foi utilizado a “massa zero”, que consiste na introdução da plataforma vazia no forno de grafite) foi analisado 11 vezes, o desvio padrão do branco (DP) é obtido e

aplicado a fórmula: $LOD = 3 \times DP/IC$ e $LOQ = 10 \times DP/IC$. Onde IC é a inclinação da curva de calibração.

O limite de detecção e de quantificação não é exigido para os métodos das categorias 1 (determinação de impurezas elementares), porém optou-se em realizar a análise desses parâmetros de validação no presente estudo.

3.8.4 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de recuperação do padrão na amostra, através da adição de três concentrações distintas do elemento em estudo antes do processo de digestão ácida para a análise de As, e para a análise direta de Pb e Cd foi adicionado três concentrações distintas na plataforma após a pesagem da amostra. A recuperação (R) ou fator de recuperação foi expresso em porcentagem.

3.8.5 Precisão

A precisão dos métodos foi comprovada através da repetibilidade. O teste foi realizado com seis amostras independentes do mesmo lote, com a adição de 10 µg/L de padrão certificado de cada elemento estudado. Para a determinação da precisão intermediária o teste de repetibilidade foi realizado novamente em dia diferente. Os resultados desta análise são combinados com os resultados do teste de repetibilidade, totalizando 12 determinações. O resultado foi expresso através do desvio padrão relativo (DPR).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DECOMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

O procedimento de preparação da amostra depende muito da natureza das substâncias que serão investigadas. Entre as técnicas utilizadas está a calcificação úmida realizada em frasco Kjeldahl com ácido nítrico, sob pressão, ou com assistência de micro-ondas (WELZ; SPERLING, 1999).

Neste trabalho, em um primeiro momento, foi testada a decomposição das amostras por digestão ácida utilizando a combinação de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, porém a amostra não foi totalmente digerida. Por esse motivo, optou-se por a digestão de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio para obter uma melhor digestão das amostras.

Para a determinação de arsênio total é necessário realizar a pré-redução, a fim de garantir que todo o arsênio presente esteja no estado trivalente. Vários agentes redutores têm sido usados para realizar a pré-redução, tais como iodeto de potássio, L-cisteína, tiourea, tiosulfato, sulfito de sódio ou cloreto de titânio. Além dos agentes redutores citados, o uso de altas concentrações de ácido clorídrico também é recomendado (WELZ; SPERLING, 1999). Por esse motivo, ao fim da digestão foi adicionado ácido clorídrico as amostras.

4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb POR HR-CS SS GFAAS

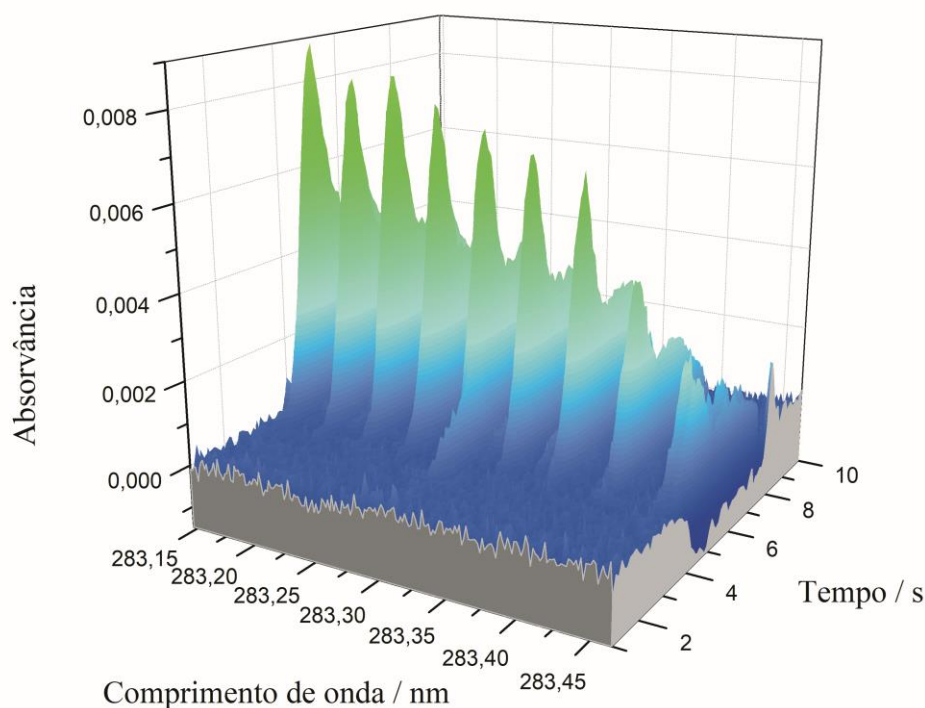
Inicialmente, foram feitos estudos para a otimização das condições de trabalho para análise direta de sólidos por GFAAS. As condições estudadas foram: temperatura de pirólise e de atomização, necessidade de uso de modificador químico, influência da massa introduzida no atomizador e fator de homogeneidade.

As interferências espectrais são um problema comum para as medidas espectrais, podendo comprometer a precisão do método. No caso da AAS, essas interferências são comumente relacionadas a moléculas ou átomos que absorvem a radiação no comprimento de onda do analito desejado ou na presença de partículas que podem causar espalhamento de radiação (WELZ; SPERLING, 1999). Na análise de amostras sólidas diretas, todos os constituintes da matriz da amostra estão presentes e podem ser uma fonte de interferência espectral. Na região espectral do chumbo pode ocorrer interferência espectral oriunda de

moléculas de SiO e PO, podendo ocasionar um aumento da absorção de radiação eletromagnética, bem como sub e sobre correções na linha base do espectro, o que interfere erroneamente nas quantificações do analito, necessitando de correção (WELZ et al, 2010).

Na determinação de chumbo, foi observado um fundo estruturado. Desta forma, foi gerado o espectro da molécula de SiO, através da introdução de 10 μL de uma solução de 10 g/L SiO_2 e 5 μL do modificador químico contendo $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Na Figura 1, está ilustrado o espectro tridimensional da estrutura de fundo observada e oriunda da molécula de SiO.

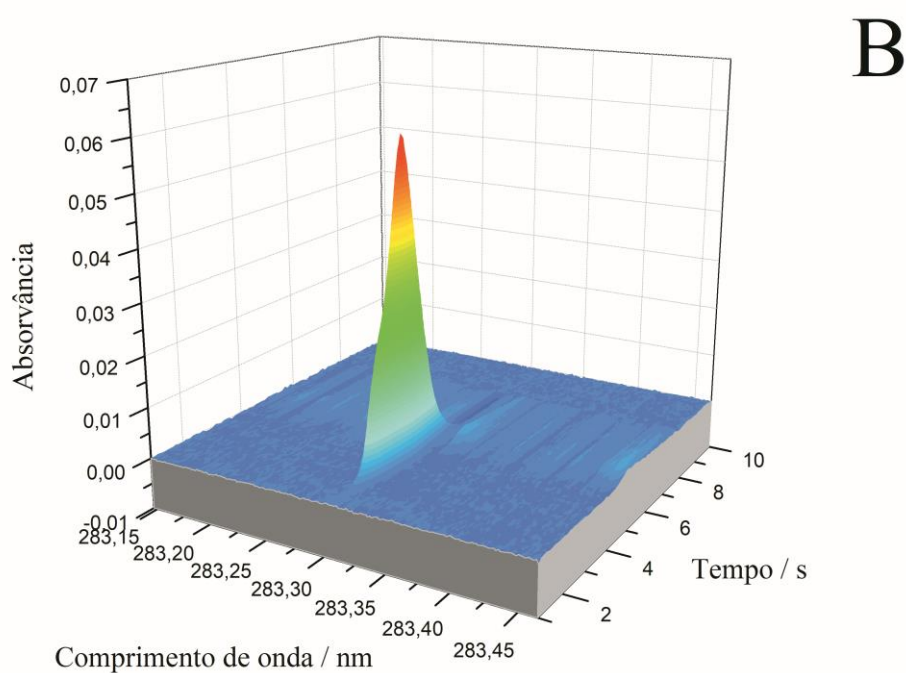
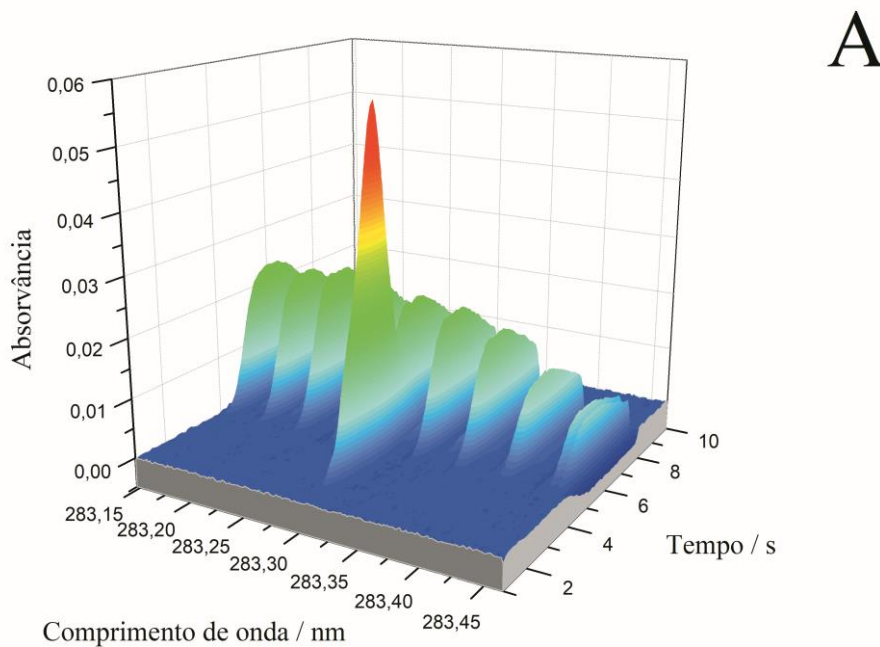
Figura 1 - Espectro obtido a partir da solução de 10 g/L SiO_2 e do modificador químico contendo $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.



Fonte: Autor.

A partir do espectro de SiO gerado, o sistema de correção de fundo por mínimos quadrados (LSBC) corrige a interferência de fundo originária destas moléculas de SiO, eliminando-a totalmente. A Figura 2 mostra que os sinais de fundo desaparecem e comprova a eficiência desse método de correção (ANDRADE et al., 2017; JACKSON, 1999; KURFÜRST, 1998; NOMURA et al., 2008).

Figura 2 - Correção de fundo com o sistema LSBC em uma amostra de suplemento alimentar: (A) espectro sem correção e (B) espectro submetido à correção LSBC.



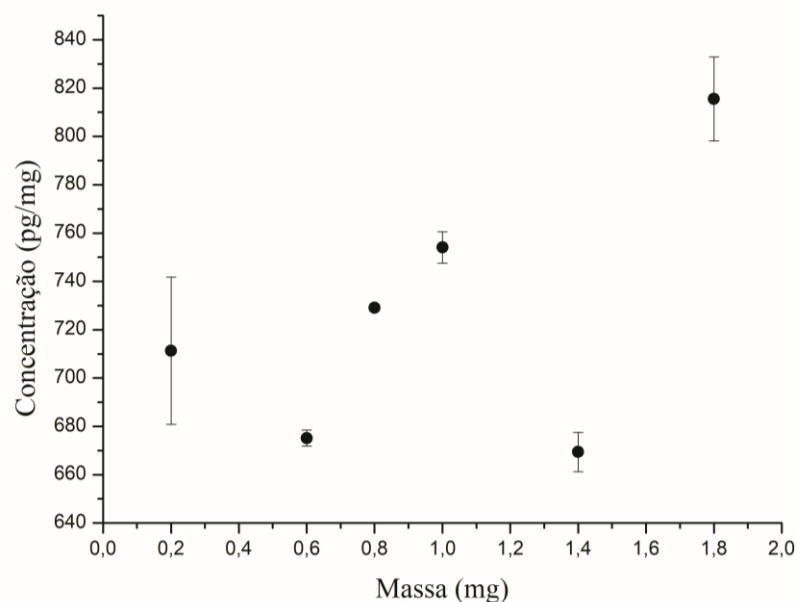
Fonte: Autor

Uma das maiores dificuldades envolvidas na análise direta de sólidos consiste na falta de homogeneidade das amostras a serem analisadas (NOMURA et al., 2008; WELZ et al., 2010). Para avaliar esta propriedade específica, a otimização da massa do suplemento alimentar

a ser introduzida no interior do forno de grafite foi conduzida com uma massa de 0,2 a 1,8 mg. Neste teste, foi escolhida uma amostra contendo uma composição complexa, incluindo espécies vegetais (Amostra 64), e o material de referência certificado do NIST contendo *Citrus Aurantium* (SRM 3260 Bitter Orange-Containing Solid Oral Form). O intervalo de sinal obtido foi normalizado para 1 mg e o desvio padrão relativo (DPR) entre três medidas sucessivas foi avaliado.

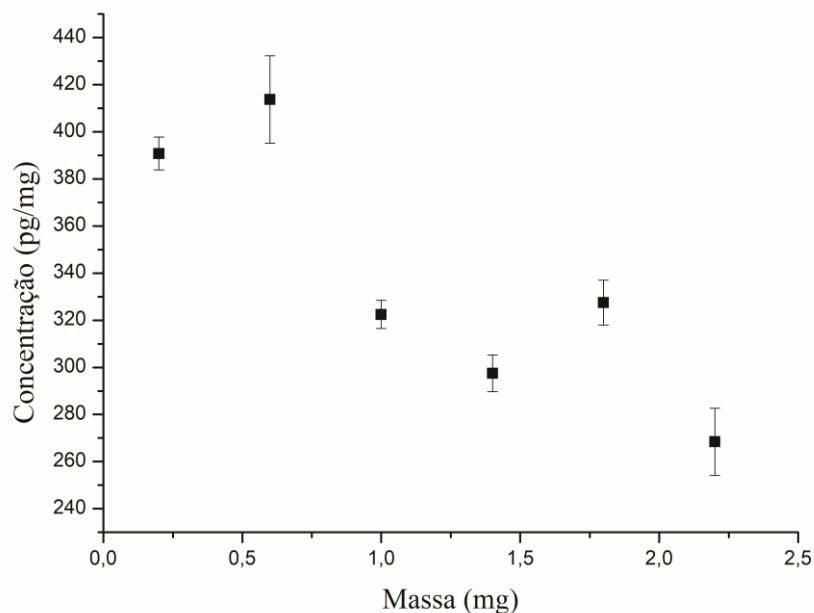
Os resultados expostos na Figura 3 mostram que para massas pequenas de suplemento alimentar (0,2 mg) obteve-se um DPR maior (30,5), mostrando que a micro heterogeneidade é crítica para esta quantidade de amostra de suplementos. A introdução de massas maiores que 1,4 mg também resulta em aumento do DPR, além da matriz não ser eliminada adequadamente durante a pirólise. Amostras contendo em torno de 1 mg das amostras de suplementos e do padrão de referência (Figura 4) foi considerada ótima para o procedimento, resultando em adequada precisão ($DPR < 6$) e eliminação eficiente da matriz da amostra a uma temperatura de pirólise de 1300 °C. Resultados semelhantes foram observados por Gunduz e Akman, que realizaram análise direta de grãos de arroz por HR-CS GFAAS. Neste estudo, também foi observado que massas maiores que 1,5 mg diminuíam a precisão do método, a qual atribuíram à atomização inadequada da matriz (GUNDUZ; AKMAN, 2013; KURFÜRST, 1998).

Figura 3 - Estudo da massa de amostra para determinação de Pb em amostra de suplemento alimentar por CS-HR SS GFAAS. As barras verticais indicam o desvio padrão relativo calculado para $n=3$.



Fonte: Autor.

Figura 4 - Estudo da massa de amostra para determinação de Pb no material de referência certificado do NIST contendo *Citrus Aurantium* (SRM 3260) por CS-HR SS GFAAS. As barras verticais indicam o desvio padrão relativo calculado para n=3.

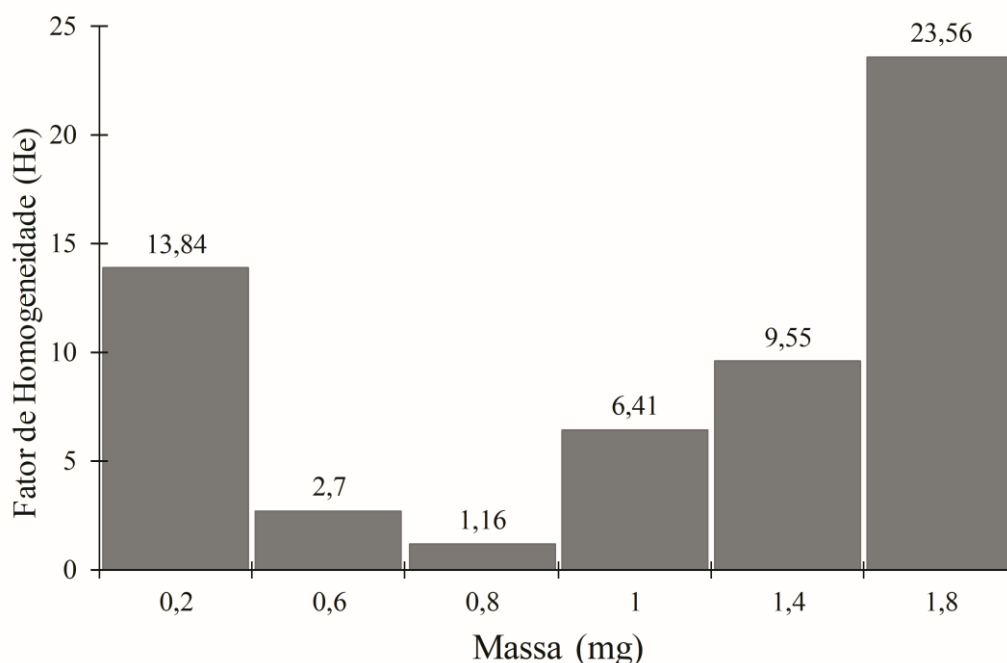


Fonte: Autor

Para avaliação da homogeneidade das amostras utilizou-se o fator de homogeneidade relativa (H_e), já discutido anteriormente. Os valores de H_e foram calculados a partir do DPR e da massa média utilizada nas determinações de Pb em amostras de suplemento alimentares por HR-CS SS GFAAS.

Para o Pb observou-se uma boa homogeneidade utilizando massas de 0,6 a 1,4 mg em amostra de suplemento alimentar (Figura 5).

Figura 5 - Estimativa do fator de homogeneidade (H_e) para Pb em amostras de suplemento alimentar.

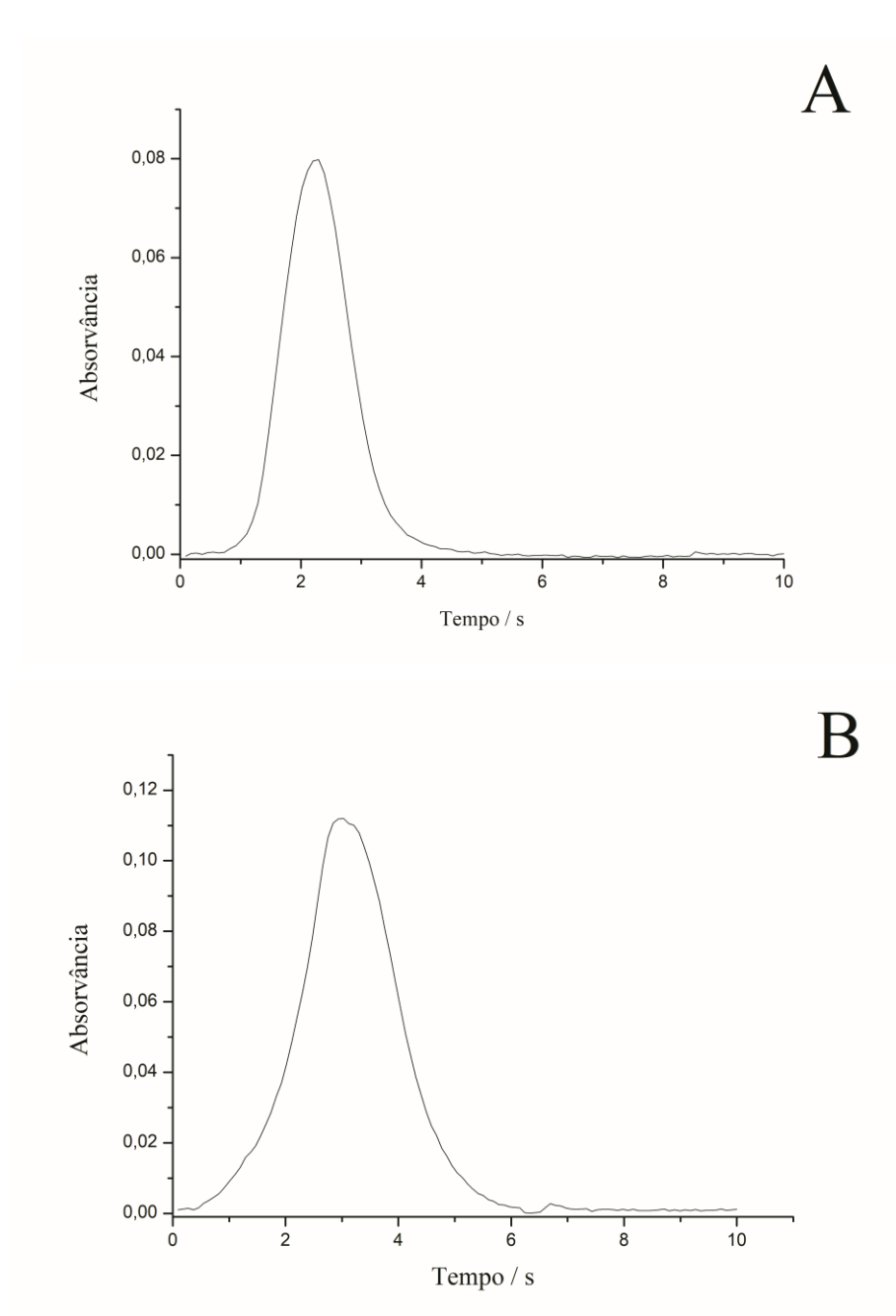


Fonte: Autor.

Para avaliar se a técnica de calibração aquosa pode fornecer resultados exatos e precisos, estudos demonstraram que a massa característica (m_0) é um bom indicativo (DONG; KRIVAN, 2001). Para isso, a massa característica do analito na solução de referência e na amostra deve possuir a mesma magnitude. Quando a massa característica do analito na solução de referência for diferente daquela do analito na amostra, os efeitos da matriz podem ser mais pronunciados (BELARRA et al., 2002; GUNDUZ; AKMAN, 2013; KURFUST et al., 1993).

A análise foi realizada pelo cálculo da m_0 como $0,0044 m/A$, onde m é a massa do analito (pg) e A é a medida da área do pico. Para a solução de Pb pipetada diretamente na amostra de suplemento alimentar, obteve-se uma massa característica ($10,70 \pm 0,02$ pg) muito próxima da obtida para a solução aquosa ($10,87 \pm 0,26$ pg). Os perfis dos sinais obtidos para a amostra de suplemento alimentar e da solução contendo Pb são apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Perfil dos sinais de Pb (A) para amostra de suplemento alimentar mais 10 $\mu\text{g/L}$ Pb; e (B) para solução aquosa de 10 $\mu\text{g/L}$ Pb.



Fonte: Autor.

A otimização foi realizada para o Pb a partir das amostras sólidas. Para escolher a melhor temperatura de pirólise e atomização, foram realizadas curvas de variação dessas temperaturas. Além disso, a influência de modificadores químicos também foi investigada, conforme descrito a seguir.

A otimização do programa de aquecimento foi realizada com uma amostra de suplemento alimentar contendo plantas e minerais (Amostra 64), a linha analítica utilizada foi

de 283,3 nm para o chumbo. Para aumentar a vida útil do forno de grafite, houve a necessidade de modificações de sua superfície. Todos os fornos de grafite, utilizados nesse estudo, foram recobertos com solução de zircônio 0,5 g/L, conforme programa de aquecimento da Tabela 4. O recobrimento foi realizado a cada 80 queimas, através da injeção de 20 µL cada vez por 25 vezes, ocorrendo a deposição de 500 µg Zr no forno. Apesar dos resíduos sólidos poderem ser removidos manualmente com cotonetes ou pincéis, esta prática não é recomendada em análise de rotina. Neste trabalho, optou-se por uma etapa adicional de pirólise para melhor decompor a matriz.

Tabela 4 - Programa de aquecimento para o recobrimento do forno de grafite com Zr.

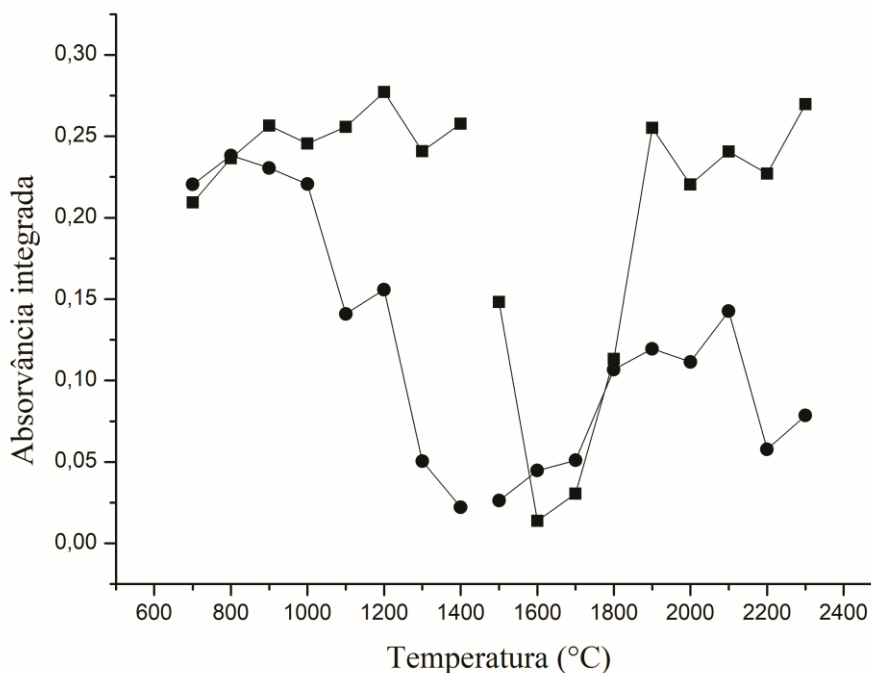
Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C / s)	Tempo (s)
Secagem	90	7	15
Secagem	140	10	15
Pirólise	1000	100	10
Atomização	2000	FP	5

*FP=Potência Máxima

Fonte: Autor.

As curvas de pirólise e atomização para avaliar o comportamento térmico do chumbo em amostras sólidas com e sem modificadores podem ser observadas na Figura 7. As temperaturas entre 700 e 2300 °C foram investigadas. O chumbo se mostrou mais termicamente estável, na amostra sólida, na presença dos modificadores químicos $Mg(NO_3)_2$ e $Pd(NO_3)_2$, com temperatura de 1300 °C e 2100 °C, de pirólise e atomização respectivamente. Na amostra sólida sem os modificadores químicos, os sinais analíticos mostraram perfis de absorvância assimétricos. Utilizou-se uma etapa adicional de pirólise a 600 °C para decompor a matriz, 20 s foram suficientes para decompor a matriz.

Figura 7 - Curvas de atomização e pirólise para o chumbo em amostra de suplemento alimentar. (■) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar com 2 μL $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e 3 μL $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$; (●) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar sem modificador.



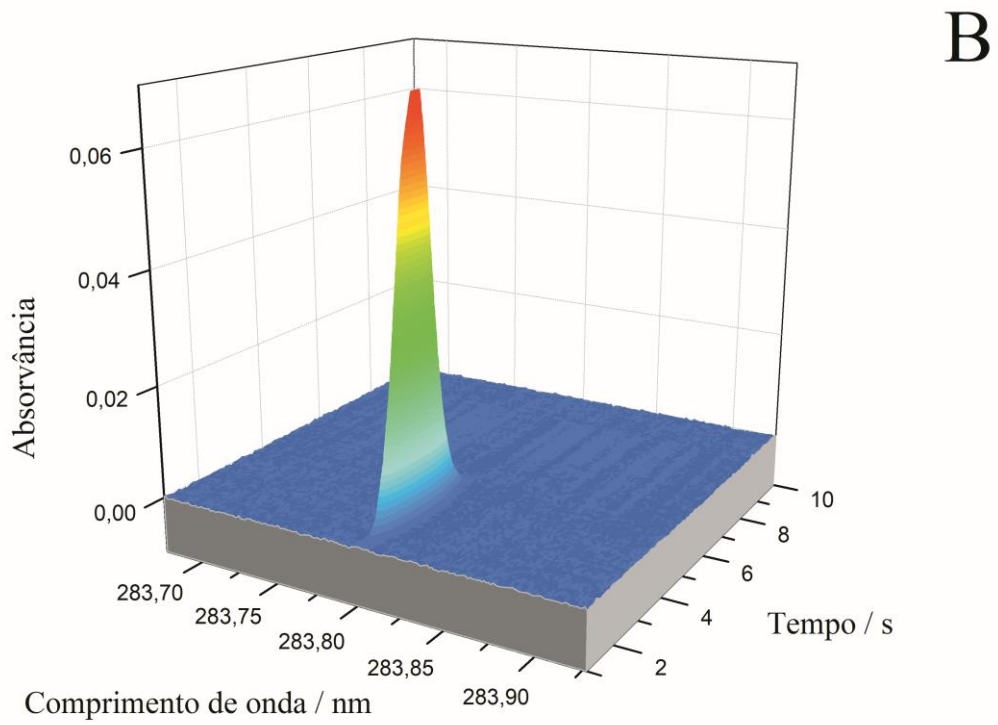
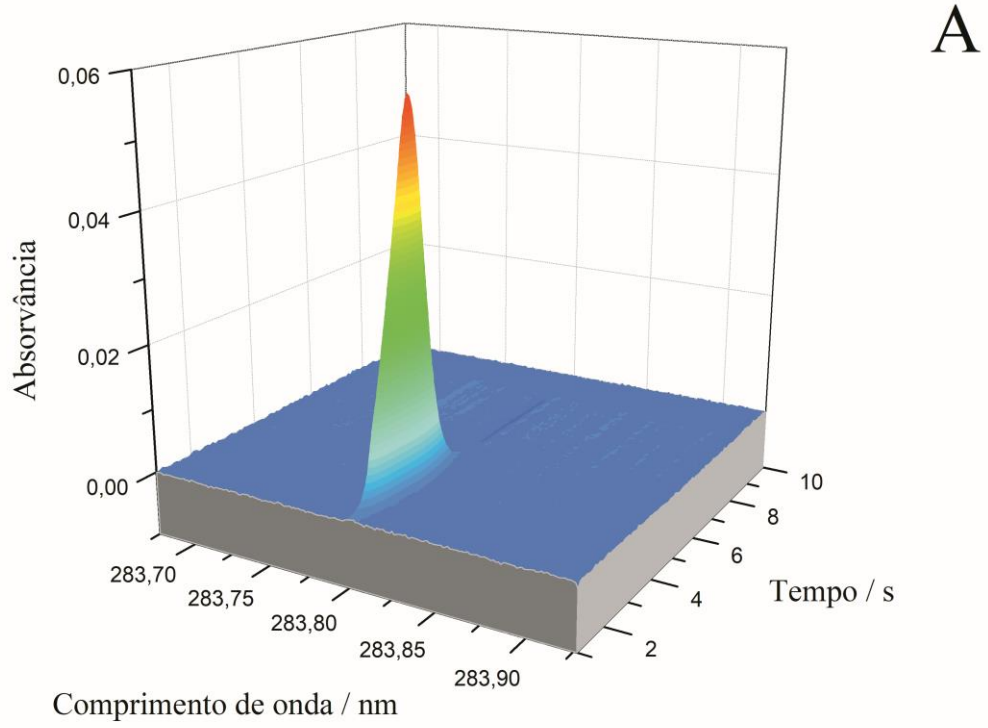
Fonte: Autor.

4.3 VALIDAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb

Para validar o método de quantificação de Pb foram determinados os parâmetros de validação estipulados pelo Capítulo <233> da USP, que são: especificidade, linearidade, faixa de concentração, limite de quantificação, precisão e exatidão.

A especificidade do método foi comprovada ao constatar que o sinal obtido pela amostra com a adição dos demais elementos em estudo não diferiu do resultado obtido da amostra sem adição dos elementos, conforme mostra a Figura 8.

Figura 8 - Especificidade de uma amostra de suplemento alimentar: (A) 10 $\mu\text{g/L}$ Pb e (B) 10 $\mu\text{g/L}$ As, Pb e Cd.



Fonte: Autor.

A faixa de concentração testada para o método foi de 0 a 400 µg/L, esse intervalo demonstrou possuir relação linear com o sinal analítico, observado pelos valores do coeficiente de correlação próximo de 1. O coeficiente de correlação atendeu a exigência de $r > 0,99$, demonstrando a linearidade do método. Os dados de linearidade validados por análise de variância (ANOVA) demonstraram regressão linear e nenhum desvio significativo da linearidade ($P < 0,05$).

O LOD e o LOQ foram determinados pelo método do branco, onde LOD é calculado de acordo com 3 vezes o desvio padrão dividido pela inclinação da curva de calibração e LOQ 10 vezes o desvio padrão dividido pela inclinação da curva de calibração. A massa característica (m_0) é definida como a massa para análise correspondente a absorvância integrada de 0,0044s. A curva de calibração foi determinada a partir da solução branca e seis concentrações de soluções de padrões aquosos (0 - 400 µg/L). As figuras de méritos para o método desenvolvido estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5- Figuras de mérito para determinação de Pb em suplementos alimentares usando HR-CS SS GFAAS. $T_{pir}=1300^{\circ}C$, $T_{at}=2100^{\circ}C$, $\lambda=283.306$ nm.

Parâmetros	Resultados
Faixa analítica (µg / L)	0-400
Inclinação ± desvio padrão ^a	$0.0058 \pm 2.0 \times 10^{-4}$
Intercepto ± desvio padrão ^a	$0.0691 \pm 3.9 \times 10^{-2}$
Limite de confiança da inclinação ^b	0.0002 to 0.0118
Limite de confiança da intercepto ^b	0.0001 to 0.1381
Coeficiente de correlação (r)	0,9969
LOD (pg)	2,16
LOQ (pg)	7,22
m_0 (pg/1%A)	10,87
Análise de variância	
Regressão linear	3289,8 (4,6 ^c)
Desvio de linearidade	2,90 (2,96 ^c)

^a Dados obtidos para três curvas de calibração

^b 95% limite de confiança.

^c Valor crítico para F a $p=0,05$

LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação; m_0 : massa característica

Fonte: Autor

Comparando o limite de detecção do método desenvolvido com outras técnicas utilizadas para determinar Pb em suplementos alimentares (Tabela 6) podemos observar que o método proposto uma alta sensibilidade, se tornando um método atrativo principalmente quando se deseja determinar os elementos em níveis de traços.

Tabela 6- Limites de detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos para o chumbo em suplementos alimentares usando diferentes técnicas e procedimentos analíticos.

LOD ($\mu\text{g/g}$)	Técnica	Detalhes	Referência
1,5	ICP-OES	Digestão por microondas com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; nebulizador concentrado	Marrero et al., 2013.
0,34*	GFAAS	Digestão por microondas com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; calibração com padrões aquosos.	Mattos et al., 2005.
0,03	ICP-MS	Digestão por microondas com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; calibração com padrões aquosos.	Moreta; Prevarin; Tubaro, 2011.
0,004	HR-CS GF AAS	Amostragem sólida direta; calibração com padrões aquosos; modificadores $\text{Pd}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	Este trabalho

* reportado somente o limite de quantificação
Fonte: Autor.

Não foram localizados na literatura nenhum estudo que tenha determinado chumbo em suplementos alimentares por HR-CS SS GFAAS. Assim os resultados obtidos nesse estudo foram comparados com estudos que relatam a determinação de chumbo em amostragens diretas com alimentos em geral e com plantas medicinais.

Usando a técnica de HR-CS SS GFAAS, Rêgo e colaboradores (2012) determinaram chumbo em amostras de plantas medicinais. Utilizando a linha analítica 283,306 nm, padrões aquosos para a curva de calibração e a solução de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificadores químicos, os autores tiveram como resultado um LOD de 11,7 pg e $\text{m}0$ de 14,8 pg.

Tinas e colaboradores (2018) determinaram chumbo em amostras de farinhas por HR-CS SS GFAAS, utilizando como modificador o $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e a linha analítica de 283,306 nm. Os resultados obtidos foram LOD de 7,2 pg e $\text{m}0$ igual a 9 pg (TINAS; OZBEK; AKMAN, 2018). Estes resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho.

Gunduz e Akman (2013) determinaram chumbo em grãos de arroz por HR-CS SS GFAAS, utilizando a linha analítica 283,306 nm e nenhum modificador químico. Os autores

obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, LOD de 2,3 pg e m₀ igual a 8,1 pg.

A precisão do método proposto foi avaliada pela repetibilidade e pela precisão intermediária realizada em dois dias diferentes, conforme orienta a USP (2017). Os resultados de desvios padrão relativos (DPR) obtidos foram de 2,98 (n=6) no ensaio de repetibilidade e de 4,20 (n=12) no ensaio de precisão intermediária. Os critérios de aceitação são: DPR < 20 (n=6) para a repetibilidade; e DPR < 25 (n=12) para a precisão intermediária.

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação do padrão na amostra e também através da análise de um material de referência certificado pelo NIST. Os resultados para o teste de exatidão por recuperação de padrão adicionado estão apresentados na Tabela 7. O material de referência certificado do NIST contendo *Citrus Aurantium* (SRM 3260 Bitter Orange-Containing Solid Oral Form) possui 240 ng/g de chumbo certificado. O método proposto apresentou um resultado de 277,6 ng/g, ou seja, uma recuperação de 115,7%. Os resultados para ambos os testes de exatidão contemplaram o critério de aceitação da USP (2017), que é de 70–150%.

Tabela 7 - Resultados de exatidão do método proposto através do ensaio de recuperação de padrão de chumbo adicionado à amostra de suplementos alimentares.

Concentração adicionada (µg/L)	Concentração encontrada (µg/L)	Recuperação (%)
10	10,69	106,87
30	30,14	100,48
50	59,84	119,69

Fonte: Autor.

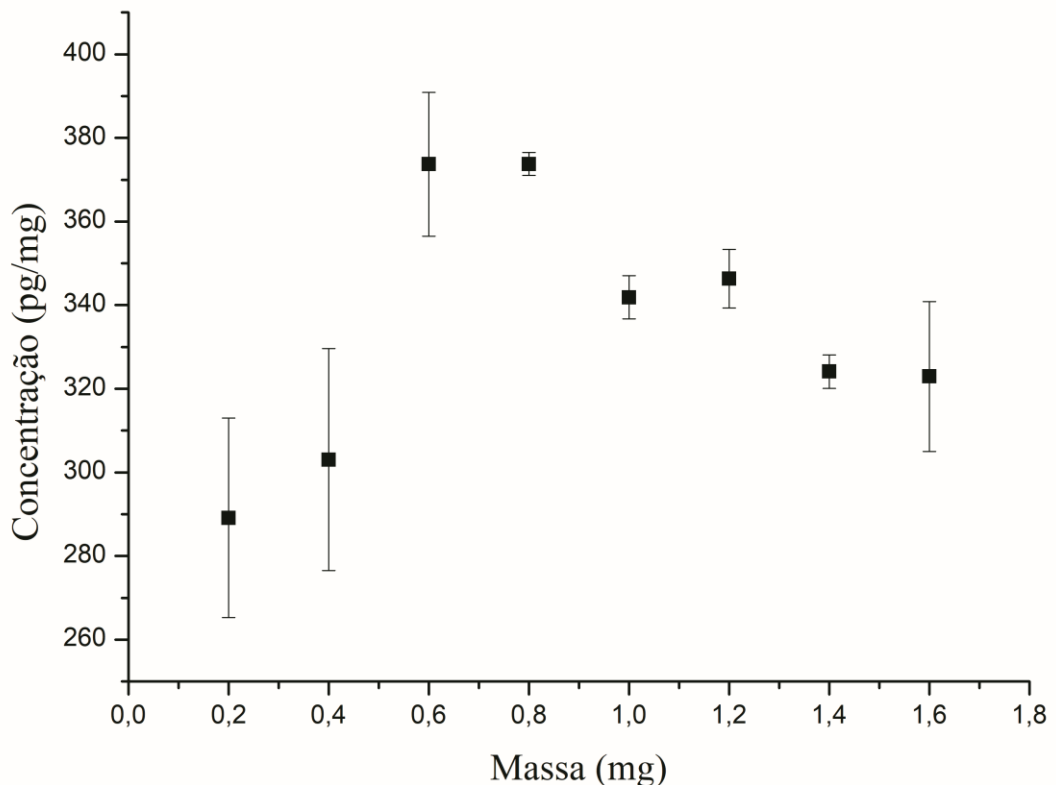
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE Cd POR HR-CS SS GFAAS

Durante a análise de Cd nas amostras não foram observados interferentes espectrais, entretanto para garantir uma boa homogeneidade da amostra foi realizada a otimização da massa de amostra de suplementos alimentares a ser introduzida no interior do forno de grafite. Uma amostra contendo uma composição complexa, incluindo espécies vegetais (Amostra 17), foi escolhida e uma massa de 0,2 a 1,6 mg foi testada. O intervalo de sinal obtido foi normalizado para 1 mg e o DPR entre três medidas sucessivas foi avaliado.

Os resultados (Figura 9) mostram que para massas pequenas de suplemento alimentar (0,2 e 0,4 mg) obteve-se um DPR maior (23,8 e 26,6), mostrando que a micro heterogeneidade é crítica para esta quantidade de amostra de suplementos. A introdução de massas maiores que 1,6 mg também resulta em aumento do DPR, além da matriz não ser eliminada adequadamente durante a pirólise. Amostras contendo em torno de 1 mg foram consideradas ótimas para o procedimento, resultando em adequada precisão ($DPR < 5,1$) e eliminação eficiente da matriz da amostra a uma temperatura de pirólise de 700 °C.

Resultados semelhantes, massas de 0,7 a 0,9 mg, foram observados por Flores e colaboradores (2009). Estes autores determinaram Cd em plantas medicinais por HR-CS GFAAS por análise direta, aplicando o $Pd(NO_3)_2$ como modificador químico.

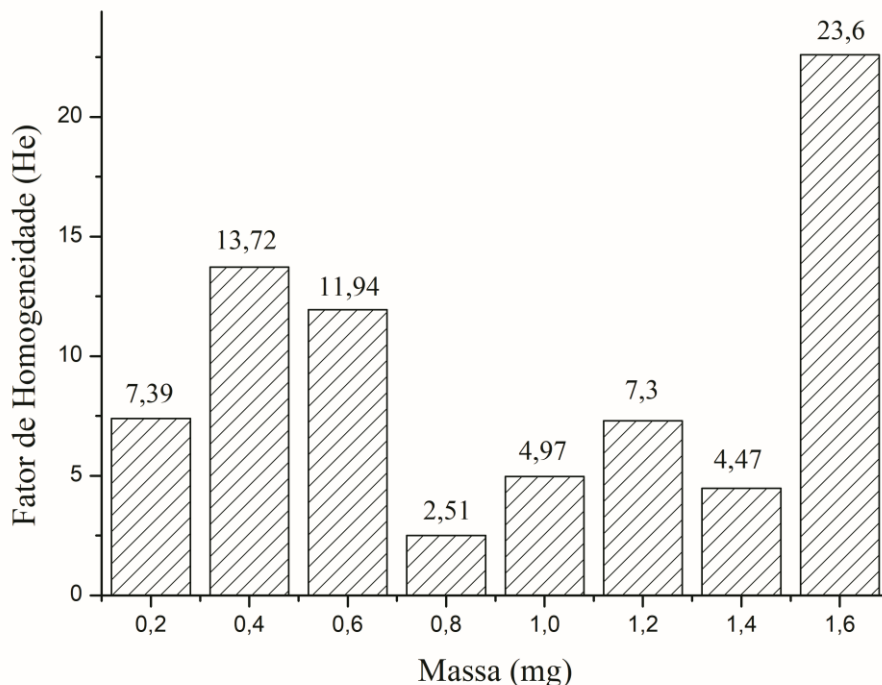
Figura 9 - Estudo da massa de amostra para determinação de Cd em amostra de suplemento alimentar. As barras verticais indicam o desvio padrão relativo calculado para $n=3$.



Fonte: Autor.

Também para avaliar a homogeneidade das amostras utilizou-se o fator de homogeneidade relativa (H_e), já discutido anteriormente. Os valores de H_e foram calculados a partir do DPR e da massa média utilizada nas determinações de Cd em amostras de suplemento alimentares por HR-CS SS GFAAS. A Figura 10 mostra que uma boa homogeneidade foi obtida utilizando massas de amostras entre 0,8 e 1,4 mg, as quais mantiveram um H_e menor que 10.

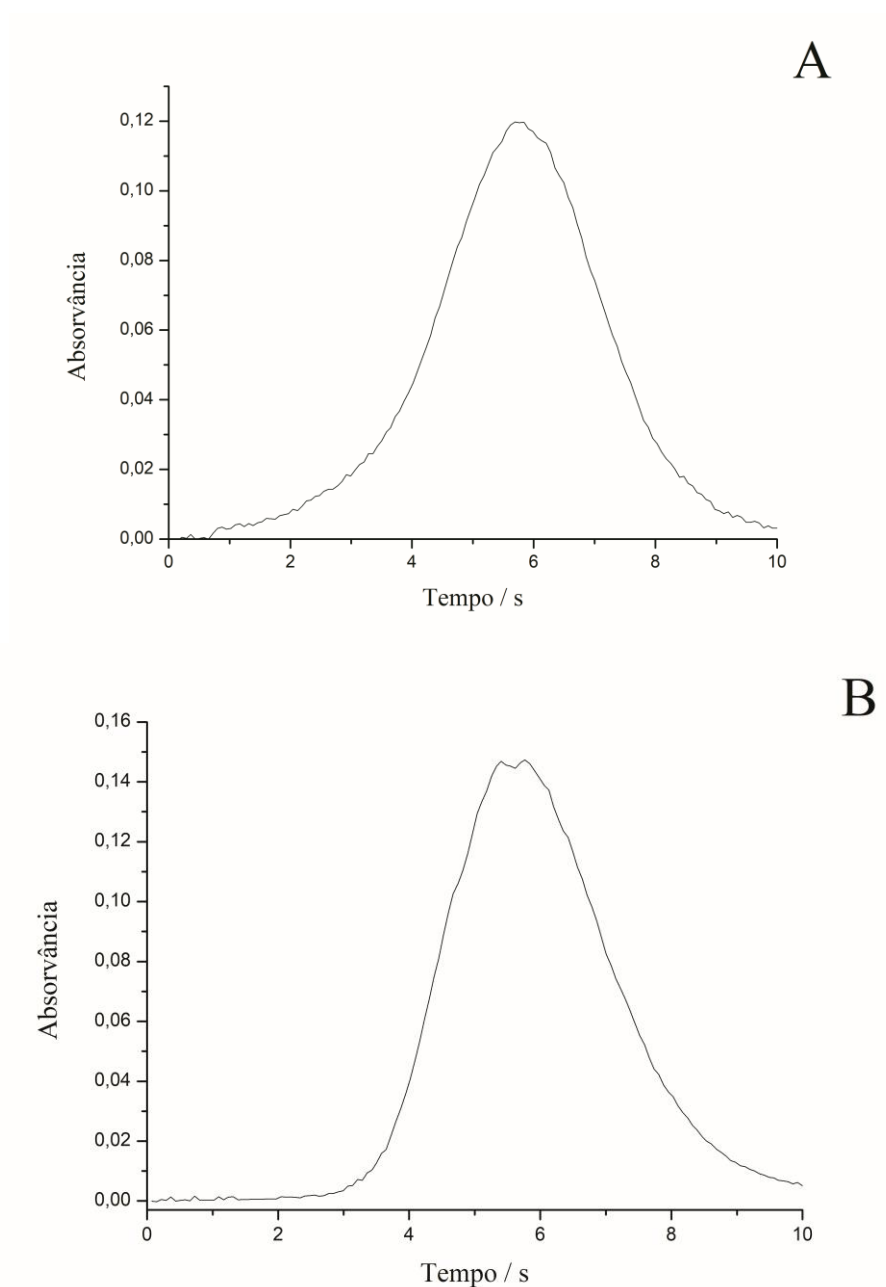
Figura 10 - Estimativa do fator de homogeneidade (H_e) para Cd em amostras de suplementos alimentares.



Fonte: Autor.

Foram determinadas as massas características do analito na solução padrão de referência e desta solução adicionada na amostra para avaliar se seria possível o uso de curva de calibração aquosa, ou se seria necessário uma curva por adição de padrão para minimizar interferências. A amostra de suplemento alimentar adicionada de Cd (10 $\mu\text{g/L}$) obteve-se uma massa característica ($0,62 \pm 0,002$ pg) muito próxima da obtida para a solução aquosa do elemento ($0,56 \pm 0,01$ pg). Além disso, os perfis dos sinais obtidos para o elemento na amostra e em solução não apresentaram diferenças significativas (Figura 11).

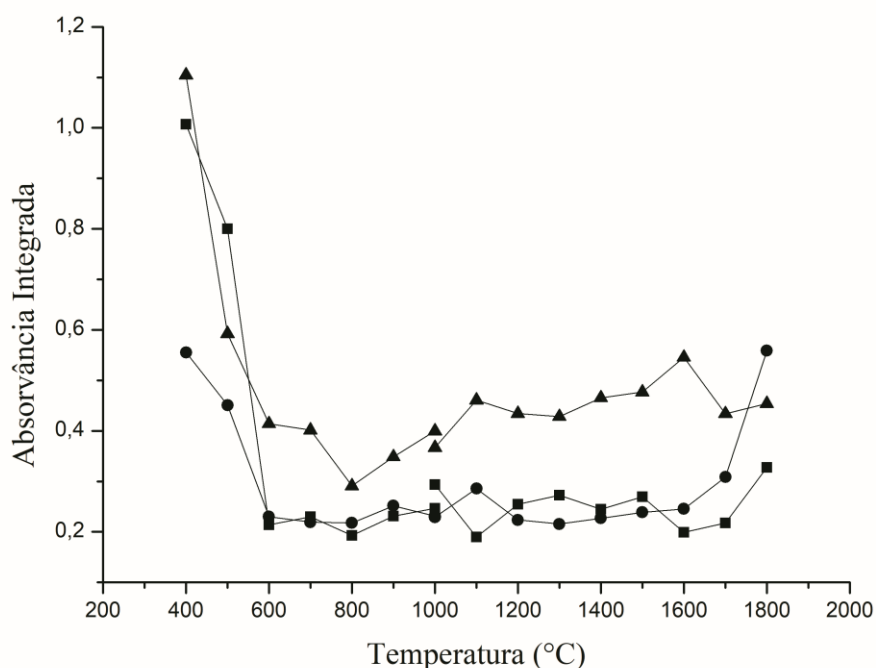
Figura 11 - Sinais de cádmio na amostra de suplemento alimentar (A) e em solução aquosa (B).



Fonte: Autor.

As curvas de pirólise e atomização para avaliar o comportamento térmico do cádmio em amostras sólidas com e sem modificadores podem ser observadas na Figura 12, todas as amostras foram adicionadas com 10 μL de solução padrão de Cd. As temperaturas entre 400 $^{\circ}\text{C}$ e 1800 $^{\circ}\text{C}$ foram investigadas. O cádmio se mostrou mais termicamente estável na presença do modificador químico $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, com temperatura de 700 $^{\circ}\text{C}$ e 1700 $^{\circ}\text{C}$, de pirólise e atomização respectivamente. Quando não foi utilizado modificador químico, os sinais analíticos mostraram perfis de absorvância assimétricos. Optou-se por uma etapa adicional de pirólise a 300 $^{\circ}\text{C}$, sendo que 20 s foram suficientes para decompor totalmente a matriz.

Figura 12 - Curvas de atomização e pirólise para o cádmio em amostra de suplemento alimentar adicionadas de 10 μL da solução padrão de Cd. (●) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra com 2 μL $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e 3 μL $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$; (■) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar com 5 μL $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$; e (▲) absorvância normalizada integrada para 1 mg de amostra de suplemento alimentar sem modificador.



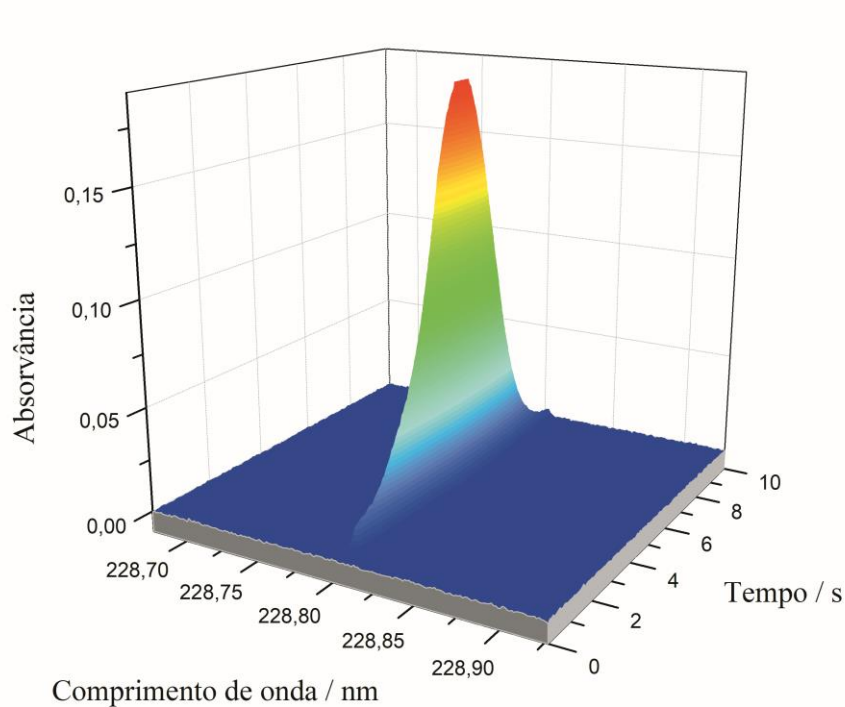
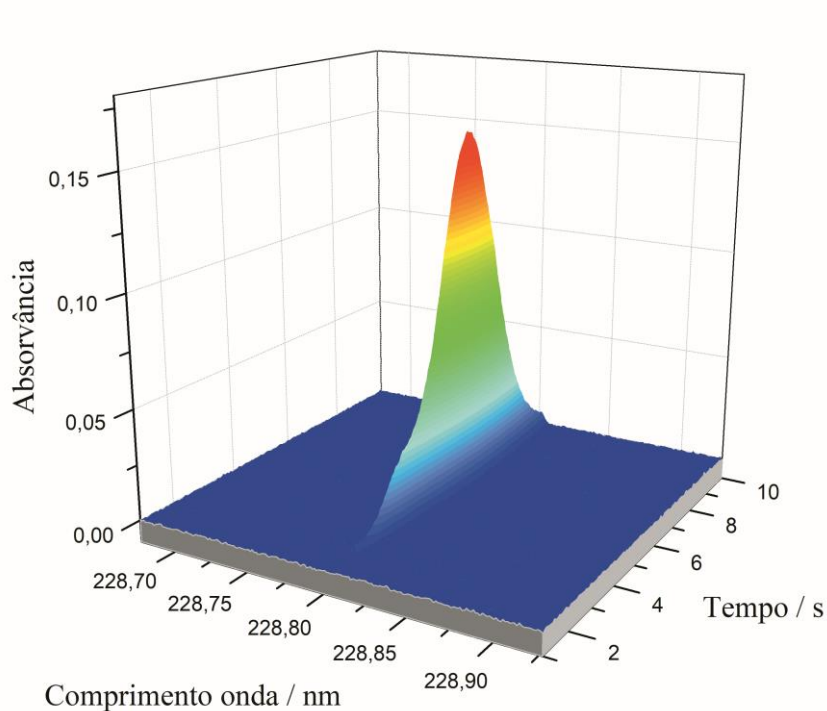
Fonte: Autor.

4.5 VALIDAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Cd

Para validar o método de quantificação de Cd foram determinados os parâmetros de validação estipulados pelo Capítulo <233> da USP, que são: especificidade, linearidade, faixa de concentração, limite de quantificação, precisão e exatidão..

A especificidade do método foi comprovada ao constatar que os sinais obtidos pela amostra com a adição dos demais elementos em estudo não diferiu da amostra sem adição dos elementos, conforme mostra a Figura 13.

Figura 13 - Especificidade de uma amostra de suplemento alimentar: (A) $10 \mu\text{g} / \text{L Cd}$ e (B) $10 \mu\text{g} / \text{L As, Pb e Cd}$.



Fonte: Autor.

A faixa de concentração testada para o método foi de 0 a $20 \mu\text{g}/\text{L}$, esse intervalo demonstrou possuir relação linear com o sinal analítico, observado pelos valores do coeficiente

de correlação próximo de 1. O coeficiente de correlação atendeu a exigência de $r > 0,99$, demonstrando a linearidade do método. Os dados de linearidade validados por análise de variância (ANOVA) demonstraram regressão linear e nenhum desvio significativo da linearidade ($P < 0,05$).

O LOD e o LOQ foram determinados pelo método do branco, a massa característica (m_0) é definida como a massa para análise correspondente a absorvância integrada de 0,0044s. A curva de calibração foi determinada a partir da solução branca e seis concentrações de soluções de padrões aquosos (0-20 $\mu\text{g/L}$). As figuras de méritos para o método desenvolvido estão resumidas na Tabela 8.

Tabela 8 - Figuras de mérito para determinação de Cd em suplementos alimentares usando HR-CS GF AAS. $T_{\text{pir}}=700^\circ\text{C}$, $T_{\text{at}}=1700^\circ\text{C}$, $\lambda=228,80\text{ nm}$.

Parâmetros	Resultados
Faixa analítica ($\mu\text{g/L}$)	0 – 20
Inclinação \pm desvio padrão ^a	$0,0052 \pm 1,4 \times 10^{-4}$
Intercepto \pm desvio padrão ^a	$0,4827 \pm 4,1 \times 10^{-2}$
Limite de confiança da inclinação ^b	0,0048 a 0,00559
Limite de confiança da intercepto ^b	0,3695 a 0,5959
Coeficiente de correlação (r)	0,9985
LOD (pg)	0,5
LOQ (pg)	1,6
m_0 (pg/1%A)	0,56
Análise de variância	
Regressão linear	590,10 (4,75 ^c)
Desvio da linearidade	0,44 (3,26 ^c)

^a Dados obtidos para três curvas de calibração

^b 95% limite de confiança

^c Valor crítico para F $p=0,05$

Fonte: Autor

Comparando o método desenvolvido com outras técnicas utilizadas para determinar Cd em suplementos alimentares (Tabela 9) podemos observar que o método proposto possui baixo limite de detecção. Desta forma, devido à sensibilidade, se torna um método adequado e eficiente para determinação Cádmio em níveis de traços. Quando a mesma técnica é aplicada,

a análise direta da amostra aumenta a sensibilidade do método, uma vez que não requer preparo da amostra.

Tabela 9 - Limites de detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos para o cádmio em suplementos alimentares usando diferentes técnicas e procedimentos analíticos.

LOD ($\mu\text{g/g}$)	Técnica	Detalhes	Referência
0,09	ICP-OES	Digestão por microondas com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; nebulizador concentrado	Marrero et al., 2013.
0,05	ICP-MS	Digestão por microondas com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; calibração com padrões aquosos.	Moreta; Prevarin; Tubaro, 2011.
0,002	HR-CS GF AAS	Amostra em pasta; calibração com adição de padrão; modificadores Pd + $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	Krawczyk, 2014
0,0009	HR-CS GF AAS	Amostragem sólida direta; calibração com padrões aquosos; modificadores $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$	Este trabalho

* reportado somente o limite de quantificação
Fonte: Autor.

Não há na literatura nenhum estudo que tenha determinado cádmio em suplementos alimentares por HR-CS SS GFAAS. Assim os resultados obtidos nesse estudo foram comparados com estudos que relatam a determinação de cádmio em amostragens diretas em plantas medicinais e alimentos.

A técnica de HR-CS SS GFAAS foi aplicada por Flores e colaboradores (2009) para determinação de cádmio em amostras de plantas medicinais utilizando a linha analítica 228,80 nm, padrões aquosos para curva de calibração e $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico. Os autores tiveram como resultado uma m_{j0} de 1,0, resultado bem próximo de encontrado no presente trabalho. No entanto, os valores de LOD e LOQ foram 41 pg e 54 pg, respectivamente.

Virgílio e colaboradores (2015) determinaram Cd em especiarias e condimentos utilizados em alimentos (canela, açafrão, alho, gengibre, etc) por HR-CS SS GFAAS. O método empregou calibração aquosa, obteve uma m_{j0} de 0,6 pg e um LOD de 0,2 ng/g.

A precisão do método proposto foi avaliada pela repetibilidade e pela precisão intermediária realizada em três dias diferentes. Os resultados de desvios padrão relativos (DPR) obtidos foram de 3,3 (n=6) no ensaio de repetibilidade e de 4,9 (n=12) no ensaio de precisão intermediária. Os critérios de aceitação são: $\text{DPR} < 20$ (n=6) para a repetibilidade; e $\text{DPR} < 25$ (n=12) para a precisão intermediária.

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação do padrão na amostra, os resultados para o teste de exatidão por recuperação estão apresentados na Tabela 10. Os resultados para os testes de exatidão contemplaram o critério de aceitação, que é de 70–150%.

Tabela 10 - Resultados de exatidão do método proposto para determinação de chumbo em amostras de suplementos alimentares.

Concentração adicionada ($\mu\text{g/L}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)
10	10,035	100,35
15	15,241	101,61
20	20,45	102,25

Fonte: Autor.

4.6 DETERMINAÇÃO DE Cd e Pb NAS AMOSTRAS

Os métodos desenvolvidos para determinação de Pb e Cd por amostragem direta de sólidos foram aplicados para determinação de 72 amostras de suplementos alimentares. Massas entre 0,8 e 1,0 mg foram empregadas para as análises no equipamento de HR-CS SS GFAAS. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 11.

Empregando o método proposto, a concentração de chumbo nas amostras, variou de 0,04 $\mu\text{g/g}$ a 1,68 $\mu\text{g/g}$. Para o cádmio, observa-se que as concentrações variaram entre 0,01 $\mu\text{g/g}$ a 0,37 $\mu\text{g/g}$.

Udousoro e colaboradores (2017) determinaram o teor de chumbo e cádmio em suplementos alimentares vendidos na Nigéria por ICP-MS e as concentrações variaram de 0,05 a 1,86 $\mu\text{g/g}$ de Pb e 0,00003 a 0,20 $\mu\text{g/g}$ de Cd. Filipiak-Szok e colaboradores (2015) também determinaram chumbo e cádmio em suplementos alimentares e plantas medicinais da Ásia e Europa por ICP-MS e as concentrações variaram entre 0,24 a 9,27 $\mu\text{g/g}$ de Pb e 0,02 a 0,25 $\mu\text{g/g}$ de Cd.

Conforme o capítulo 2232 da Farmacopeia Americana (USP, 2017d), o limite para chumbo em suplementos alimentares é de 10 $\mu\text{g/dia}$. Dentre as amostras analisadas, duas tiveram resultados acima do permitido. A amostra 6 com 14,6 $\mu\text{g/dia}$ e a amostra 45 com 25,3 $\mu\text{g/dia}$. O limite para cádmio em suplementos alimentares pela USP é de 5 $\mu\text{g/dia}$, nas amostras analisadas uma amostra teve resultado acima do permitido, a Amostra 6 com 6,97 $\mu\text{g/dia}$.

Outra irregularidade foi observada em dois produtos (Amostras 37 e 61), as quais

declaravam ser isentos de registro sanitário conforme a RDC ANVISA nº 27/2010. Esta normativa da Anvisa dispensa de registro sanitário e consequentemente da análise de contaminantes inorgânicos. Todavia, de acordo com a composição declarada no rótulo, estes produtos são enquadrados na RDC ANVISA nº 16/1999, que exige registro sanitário e análise de contaminantes inorgânicos (BRASIL, 1999a; BRASIL, 2010b). A amostra 37 contém chá verde na sua formulação. De acordo com a Anvisa, chás em formas farmacêuticas como comprimidos, cápsulas ou tabletes se enquadram como novos alimentos. Da mesma forma, a amostra 61 contém espirulina e se enquadra como um novo alimento. Ambas amostras apresentaram valores de chumbo acima do permitido que é de 0,8 µg/g (BRASIL, 1965). A Amostra 38 apresentou 1,42 µg Pb/g e a amostra 37 continha 0,875 µg Pb/g.

O chumbo e o cádmio podem ser encontrados em suplementos alimentares, principalmente aqueles a base de plantas, uma vez que ocorre naturalmente no ambiente. Os principais fatores da presença destes elementos tóxicos é a contaminação do solo por insumos antropogênicos de produtos agrícolas e industriais (SZOK; KURZAWA; SZKYK, 2015).

Apesar de poucos produtos conterem limites acima do permitido, a exposição crônica a altos níveis desses metais tóxicos pode causar uma variedade de efeitos adversos à saúde. O chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo, a toxicidade do chumbo gera desde efeitos claros, ou clínicos, até efeitos sutis, ou bioquímicos. O chumbo afeta adversamente vários órgãos e sistemas, sendo que as alterações celulares e os efeitos neurológicos sobre o desenvolvimento parecem ser os mais críticos. Esse metal produz efeitos sobre muitos processos bioquímicos; em particular, afeta a síntese da heme, o sistema hematopoiético e a homeostase do cálcio, interferindo em outros processos celulares (MOREIRA; MOREIRA, 2004). A exposição ao cádmio produz uma extensa variedade de efeitos adversos envolvendo muitos órgãos e sistemas, os mais relatados são a disfunção tubular renal e o distúrbio do metabolismo do cálcio e da vitamina D, podendo levar a danos na calcificação óssea (MUNIZ; FILHO, 2006).

Tabela 11 – Concentração de chumbo e cádmio em suplementos alimentares.

(continua)

Amostra	Forma de dosagem	Chumbo		Cádmio	
		Concentração ($\mu\text{g/g}$) ^a	Concentração ($\mu\text{g/dia}$)	Concentração ($\mu\text{g/g}$) ^a	Concentração ($\mu\text{g/dia}$)
1	Cápsula	0,27±0,01	0,68	<LOQ	<LOQ
2	Cápsula	ND	-	<LOQ	<LOQ
3	Pó a granel	ND	-	ND	ND
4	Pó a granel	ND	-	ND	ND
5	Cápsula	0,64±0,03	0,62	0,11±0,02	0,11
6	Cápsula	7,01±0,68	14,61	0,33±0,01	6,97
7	Cápsula incolor	0,31±3,24	0,44	ND	ND
	Cápsula vermelha	ND	-	<LOQ	<LOQ
8	Pó a granel	ND	-	ND	ND
9	Pó a granel	ND	-	ND	ND
10	Pó a granel	ND	-	ND	ND
11	Comprimido	0,21±0,005	0,31	0,07±0,01	0,10
12	Cápsula	0,30±0,03	1,12	<LOQ	<LOQ
13	Cápsula	0,42±0,03	-	<LOQ	<LOQ
14	Cápsula	ND	-	ND	ND
15	Cápsula	0,42±0,03	1,84	<LOQ	<LOQ
16	Cápsula	0,50±0,03	1,32	<LOQ	<LOQ
17	Cápsula	0,06±0,01	0,39	ND	ND
18	Cápsula	ND	-	0,01±0,003	0,03
19	Cápsula	0,39±0,02	0,98	<LOQ	<LOQ
20	Pó à granel	ND	-	ND	ND
21	Tablete	0,74±0,02	5,19	ND	ND
22	Pó à granel	ND	-	ND	ND
23	Cápsula	ND	-	0,01±0,002	0,02
24	Cápsula	ND	-	<LOQ	<LOQ
25	Cápsula	1,13±0,05	1,04	ND	ND

Tabela 12 – Concentração de chumbo e cádmio em suplementos alimentares.

(continuação)

26	Pó à granel	ND	ND	ND	ND
27	Cápsula	0,6±0,03	3,12	ND	ND
28	Pó à granel	ND	-	ND	ND
29	Sachês	ND	-	ND	ND
30	Comprimido	0,16±0,01	0,13	ND	ND
31	Cápsula	ND	-	ND	ND
32	Cápsula	ND	-	ND	ND
33	Pó à granel	ND	-	ND	ND
34	Pó à granel	ND	-	ND	ND
35	Cápsula	ND	-	ND	ND
36	Pó à granel	ND	-	ND	ND
37	Cápsula	0,87±0,05	2,12	ND	ND
38	Sachê	ND	-	ND	ND
39	Cápsula	0,37±0,05	0,59	<LOQ	<LOQ
40	Pó à granel	ND	-	ND	ND
41	Pó à granel	ND	-	ND	ND
42	Pó à granel	ND	-	ND	ND
43	Cápsula	0,49±0,02	1,83	<LOQ	<LOQ
44	Cápsula	0,45±0,02	3,77	0,10±0,01	1,53
45	Pó à granel	1,68±0,24	25,27	ND	ND
46	Cápsula	0,04±0,0002	0,08	ND	ND
47	Cápsula	0,09±0,02	0,08	<LOQ	<LOQ
48	Pó à granel	ND	-	ND	ND
49	Cápsula	ND	-	<LOQ	<LOQ
50	Tablete	0,22±0,02	0,21	<LOQ	<LOQ
51	Cápsula	ND	-	ND	ND
52	Cápsula	ND	-	ND	ND
53	Cápsula	ND	-	<LOQ	<LOQ

Tabela 13 – Concentração de chumbo e cádmio em suplementos alimentares.

					(continuação)	
54	Cápsula	0,13±0,02	0,33	ND	ND	
55	Pó à granel	ND	-	ND	ND	
56	Cápsula	0,44±0,07	1,66	ND	ND	
57	Cápsula	ND	-	ND	ND	
58	Pó à granel	ND	-	0,06±0,01	0,08	
59	Tablete	0,23±0,02	0,32	ND	ND	
60	Cápsula	ND	-	ND	ND	
61	Cápsula	1,42±0,13	6,12	ND	ND	
62	Cápsula	ND	-	<LOQ	<LOQ	
63	Pó à granel	ND	-	0,37±0,01	0,46	
64	Cápsula	0,50±0,05	0,61	ND	ND	
65	Pó à granel	ND	-	ND	ND	
66	Pó à granel	ND	-	<LOQ	<LOQ	
67	Pó à granel	ND	-	<LOQ	<LOQ	
68	Cápsula	0,34±0,03	1,74	ND	ND	
69	Pó a granel	0,32±0,05	0,48	ND	ND	
70	Cápsula	0,41±0,05	2,50	<LOQ	<LOQ	
71	Cápsula	0,27±0,01	0,68	<LOQ	<LOQ	
72	Cápsula	ND	-	ND	ND	

^a Todos os valores indicam a diferença de desvios padrão para n=3.

Fonte: Autor.

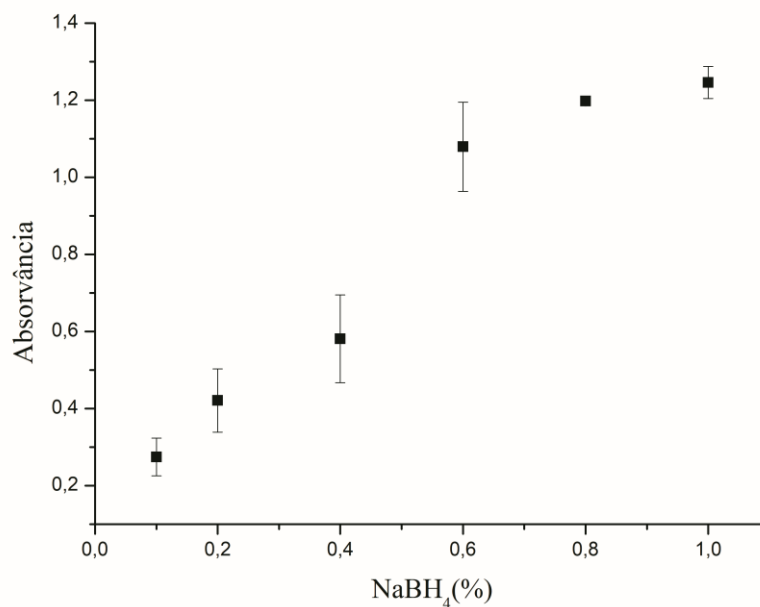
4.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE As POR HGAAS

Na geração de hidretos é requerido que a amostra esteja na forma líquida, para a análise de amostras sólidas, como é o caso dos suplementos alimentares analisados, estas passaram pela etapa de preparo de amostra.

As variáveis que podem influenciar na etapa de geração de hidretos como concentração do agente redutor e do ácido foram otimizadas. A otimização foi realizada utilizando uma amostra que continha materiais vegetais (Amostra 17), foi adicionado na amostra 10 µg/L da solução padrão de arsênio.

Para otimização da concentração de NaBH₄ foi estudada a faixa de concentração de 0,1 a 1% (m/v) e o resultado pode ser observado na Figura 14. Analisando os resultados obtidos observa-se que a concentração do agente redutor que melhor promove a geração de hidretos do arsênio é a de 0,8%. É observado um aumento significativo na absorvância à medida que se aumenta a concentração do agente redutor até 0,6%, porém a maior intensidade foi obtida com uma concentração de 0,8%. Acima deste valor ocorre uma queda na intensidade de sinal, que se deve possivelmente a um excesso na formação do gás hidrogênio que é arrastado para a célula de absorção causando um impedimento na interação entre o vapor do atômico e a radiação. Portanto a concentração escolhida para o seguimento dos experimentos foi a de 0,8% na presença de 0,15% de NaOH.

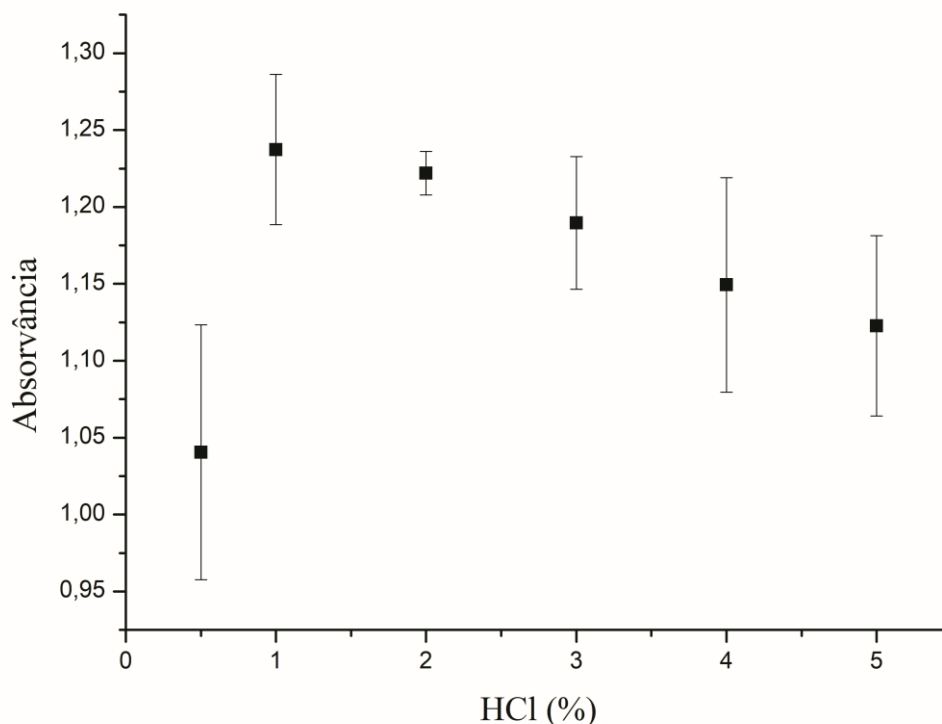
Figura 14 - Estudo da concentração de NaBH_4 na determinação de As. Condições: HCl 3% (m/v) e Amostra 17 adicionada com $10 \mu\text{g/L}$ As.



Fonte: Autor.

O estudo da concentração de ácido é fundamental, pois a partir da hidrólise ácida do NaBH_4 , é formado o hidrogênio que reduz o analito a sua forma de hidreto. A Figura 15 mostra o resultado deste estudo. Foram estudadas concentrações de HCl na faixa de 0,5 a 5% (v/v). A concentração de HCl 1,0% apresentou um maior sinal do analito, mas ocorreu um aumento na dispersão dos resultados. Desta forma, a concentração de HCl 2,0% (v/v) foi escolhida. O esperado seria que o aumento na concentração de HCl promovesse um crescimento na absorvância. Entretanto, como o arsênio absorve a radiação em um comprimento muito baixo, perto do limite mínimo da lâmpada, talvez cause instabilidade do sinal.

Figura 15 - Estudo da concentração de HCl na determinação de As. Condições: 0,8% NaBH₄, 0,15% NaOH e Amostra 17 adicionada de 10 µg/L As.



Fonte: Autor.

4.8 VALIDAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE As POR HG AAS

Para validar o método de quantificação de As foram determinados os parâmetros de validação estipulados pelo Capítulo <233> da USP, que são: especificidade, faixa de concentração, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão. A validação foi realizada com uma amostra contendo uma composição complexa, incluindo espécies vegetais (Amostra 17), e uma massa entre 0,5 a 0,8 mg foi pesada.

A especificidade do método foi comprovada ao constatar que os resultados obtidos pela amostra com a adição de 15 µg/L dos elementos em estudo (As, Cd e Pb), apresentou uma concentração média de 14,39 µg/L, o que não diferiu do resultado obtido da amostra com adição apenas do As (15,01 µg/L).

As figuras de mérito para o método desenvolvido estão resumidas na Tabela 12. A faixa de concentração do analito testada para o método foi de 0 a 20 µg/L. Esse intervalo demonstrou possuir relação linear com o sinal analítico, observado pelos valores do coeficiente de

correlação próximo de 1. O coeficiente de correlação atendeu a exigência de $r > 0,99$, demonstrando a linearidade do método. Os dados de linearidade validados por análise de variância (ANOVA) demonstraram regressão linear e nenhum desvio significativo da linearidade ($P < 0,05$).

O LOD e o LOQ foram determinados pelo método do branco e a curva de calibração foi determinada a partir da solução branca e quatro concentrações de soluções de padrões aquosos (0-20 $\mu\text{g/L}$).

Tabela 14 - Figuras de mérito para determinação de As em suplementos alimentares usando HGAAS.

Parâmetros	Resultados
Faixa analítica ($\mu\text{g/L}$)	0 – 20
Inclinação \pm desvio padrão ^a	$0,1039 \pm 2,5 \times 10^{-3}$
Intercepto \pm desvio padrão ^a	$0,0492 \pm 3,1 \times 10^{-2}$
Limite de confiança da inclinação ^b	0,0967 a 0,1110
Limite de confiança da intercepto ^b	-0,038 a 0,1364
Coeficiente de correlação (r)	0,9988
LOD ($\mu\text{g/L}$)	0,371
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	1,27
c_0 ($(\mu\text{g/L}) / 1\%A$)	0,041
Análise de variância	
Regressão linear	2021,01 (4,75 ^c)
Desvio de linearidade	1,24 (3,26 ^c)

^a Dados obtidos para três curvas de calibração.

^b 95% limite de confiança.

^c Valor crítico para F $p=0,05$.

Fonte: Autor.

O capítulo <233> não exige a determinação dos limites de detecção para a categoria II (impurezas elementares), porém para validar esse método optou-se por determinar esses parâmetros.

Comparando o método desenvolvido com outras técnicas utilizadas para determinar As em suplementos alimentares (Tabela 13) podemos observar que o método proposto possui o

menor limite de detecção, se tornando um método mais atrativo principalmente quando se deseja determinar os elementos em níveis de traços.

Tabela 15 - Limites de detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos para o arsênio em suplementos alimentares usando diferentes técnicas e procedimentos analíticos.

LOD ($\mu\text{g/g}$)	Técnica	Detalhes	Referência
1,2	ICP-OES	Digestão por microondas com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; nebulizador concentrado	Marrero et al., 2013.
0,11	ICP-MS	Digestão por microondas com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; calibração com padrões aquosos.	Moreta; Prevarin; Tubaro, 2011.
0,08	HR-CS GFAAS	Amostra em pasta; calibração com adição de padrão; modificador $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$.	Krawczyk, 2014
0,02	HGAAS	Digestão por via úmida $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$; calibração com padrões aquosos.	Este trabalho

Fonte: Autor.

Não foram encontradas estudos que tenham determinado arsênio em suplementos alimentares por HGAAS. Assim, os resultados obtidos nesse estudo foram comparados com estudos que relatam a determinação de arsênio por HGAAS em plantas medicinais. O estudo realizado por Gulay e colaboradores (2015) determinou arsênio em *Helianthus annuus* L. por HGAAS, o método validado apresentou um LOD de $0,02 \mu\text{g/g}$, resultado semelhante ao presente estudo (GULAY; AYCA; YILDIZ, 2015). Os mesmos resultados podem ser observados no estudo de Frank e colaboradores, que determinou arsênio em plantas por HGAAS e ICP-MS, no método desenvolvido por HGAAS obteve resultado parecido com o do nosso trabalho, obteve um LOD de $0,019 \mu\text{g/g}$ (FRANK; KRACHLER; SHOTYK, 2005).

A precisão do método proposto foi avaliada pela repetibilidade e pela precisão intermediária realizada em três dias diferentes. Os resultados de DPR foram de 4,9 ($n=6$) no ensaio de repetibilidade e de 6,0 ($n=12$) no ensaio de precisão intermediária. Os critérios de aceitação são $\text{DPR}<20$ ($n=6$) para a repetibilidade e $\text{DPR}<25$ ($n=12$) para a precisão intermediária.

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação do padrão na amostra, os resultados para o teste de exatidão por recuperação estão apresentados na Tabela 14. Os resultados para os testes de exatidão contemplaram o critério de aceitação, que é de 70–150%.

Tabela 16 - Resultados de exatidão do método proposto para determinação de arsênio em amostras de suplementos alimentares.

Concentração adicionada ($\mu\text{g/L}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)
10	11,7	101,5
15	16,5	99,3
20	25,1	116,3

Fonte: Autor

4.9 DETERMINAÇÃO DE As NAS AMOSTRAS

Depois da otimização dos parâmetros de validação, o método proposto foi aplicado para a análise de 72 amostras de suplementos alimentares após digestão ácida. Massas entre 0,5 e 1,0 mg foram pesadas para as análises no equipamento de HGAAS.

Os resultados obtidos com o método proposto em 72 amostras de suplementos alimentares estão descritos na Tabela 15. As concentrações de arsênio variaram entre 0,02 $\mu\text{g/g}$ a 0,73 $\mu\text{g/g}$. Conforme o capítulo 2232 da Farmacopeia Americana (USP, 2017), os limites para arsênio em suplementos alimentares é de 15 $\mu\text{g/dia}$, portanto todas as amostras analisadas estão em concordância com o limite estabelecido.

Hedegaar e colaboradores (2013) determinaram arsênio em suplementos dietéticos à base de ervas, de origem chinesa e dinamarquesa, por ICP-MS. Os resultados obtidos foram de 0,03 a 3,2 $\mu\text{g/g}$ de arsênio inorgânico. De acordo com a Farmacopeia Americana apenas um suplemento excedia o limite deste contaminante (HEDEGAAR; ROKKJAER; SLOTH, 2013). Outro estudo de Krawczyk determinou elementos traços em suplementos multivitamínicos por HR-CS GFAAS, onde as concentrações de As foram de 0,1 a 0,2 $\mu\text{g/comprimido}$ (KRAWCZYK, 2014).

Poucos estudos determinaram que o arsênio estava presente em suplementos alimentares em altas concentrações. Contudo, uma vez que vários alimentos também contêm este contaminante a contribuição de cada fonte de exposição torna-se relevante. A exposição crônica ao As pode induzir o estresse oxidativo, aumentar a pressão arterial, além de causar aterosclerose, doenças isquêmicas do coração e arritmias (SINGH, GOEL, TARJPREET, 2011).

Tabela 17 - Concentração de arsênio em suplementos alimentares.

(continua)

Amostra	Forma de dosagem	Concentração ($\mu\text{g/g}$) ^a	Concentração ($\mu\text{g/dia}$)
1	Cápsula	0,04±0,01	0,11
2	Cápsula	<LOQ	<LOQ
3	Pó a granel	<LOQ	<LOQ
4	Pó a granel	0,15±0,01	1,23
5	Cápsula	ND	ND
6	Cápsula	ND	ND
7	Cápsula incolor	ND	ND
	Cápsula vermelha	<LOQ	<LOQ
8	Pó a granel	ND	ND
9	Pó a granel	<LOQ	<LOQ
10	Pó a granel	0,08±0,01	2,60
11	Comprimido	0,21±0,01	0,29
12	Cápsula	<LOQ	<LOQ
13	Cápsula	0,73±0,04	2,41
14	Cápsula	<LOQ	<LOQ
15	Cápsula	0,09±0,01	0,34
16	Cápsula	0,15±0,02	0,40
17	Cápsula	0,08±0,01	0,50
18	Cápsula	<LOQ	<LOQ
19	Cápsula	0,06±0,01	0,16
20	Pó à granel	0,13±0,01	0,65
21	Tablete	0,21±0,02	1,48
22	Pó à granel	<LOQ	<LOQ
23	Cápsula	<LOQ	<LOQ
24	Cápsula	0,12±0,01	0,22
25	Cápsula	<LOQ	<LOQ
26	Pó à granel	<LOQ	<LOQ
27	Cápsula	<LOQ	<LOQ
28	Pó à granel	<LOQ	<LOQ
29	Sachês	0,24±0,04	1,70
30	Comprimido	0,13±0,01	0,11
31	Cápsula	<LOQ	<LOQ
32	Cápsula	ND	ND
33	Pó à granel	<LOQ	<LOQ
34	Pó à granel	ND	ND
35	Cápsula	<LOQ	<LOQ
36	Pó à granel	<LOQ	<LOQ
37	Cápsula	0,11±0,01	0,26
38	Sachê	<LOQ	<LOQ
39	Cápsula	0,06±0,01	0,09
40	Pó à granel	ND	ND
41	Pó à granel	<LOQ	<LOQ
42	Pó à granel	ND	ND
43	Cápsula	<LOQ	<LOQ
44	Cápsula	ND	ND
45	Pó à granel	<LOQ	<LOQ

Tabela 17 - Concentração de arsênio em suplementos alimentares.

				(continuação)
46	Cápsula	0,11±0,01		0,21
47	Cápsula	0,10±0,02		0,10
48	Pó à granel	0,02±0,003		1,44
49	Cápsula	ND		ND
50	Tablete	ND		ND
51	Cápsula	ND		ND
52	Cápsula	ND		ND
53	Cápsula	<LOQ		<LOQ
54	Cápsula	ND		ND
55	Pó à granel	0,08±0,01		0,38
56	Cápsula	<LOQ		<LOQ
57	Cápsula	ND		ND
58	Pó à granel	0,08±0,01		0,34
59	Tablete	0,11±0,02		0,15
60	Cápsula	0,10±0,01		0,06
61	Cápsula	0,44±0,05		1,91
62	Cápsula	0,14±0,01		0,07
63	Pó à granel	0,10±0,002		0,48
64	Cápsula	0,15±0,02		0,18
65	Pó à granel	0,07±0,01		2,08
66	Pó à granel	0,11±0,01		4,16
67	Pó à granel	0,04±0,01		0,13
68	Cápsula	0,31±0,03		1,58
69	Pó a granel	0,05±0,01		0,31
70	Cápsula	0,11±0,01		0,10
71	Cápsula	0,14±0,003		0,21
72	Cápsula	0,15±0,01		0,90

^a Todos os valores indicam a diferença de desvios padrão para n=3.

Fonte: Autor.

5 CONCLUSÃO

Os contaminantes chumbo, cádmio e arsênio foram determinados em suplementos alimentares comercializados no Brasil. A técnica de espectrometria de absorção atômica foi aplicada nestas determinações por ser altamente sensível e específica para determinação de impurezas inorgânicas.

A HR-CS SS GFAAS foi aplicada para determinação de Pb e Cd e HGAAS para a determinação de As nos produtos. Os parâmetros de validação de acordo com a Farmacopeia Americana foram aplicados no desenvolvimento do método. Todos os métodos desenvolvidos mostraram-se específicos, lineares, sensíveis, precisos e exatos. O trabalho tem caráter inédito em relação a determinação de impurezas elementares em amostras de suplementos alimentares pelas técnicas de HR-CS SS GFAAS e HGAAS.

Os métodos desenvolvidos foram aplicados em setenta e duas amostras de suplementos alimentares. Quatro produtos apresentaram quantidades de Pb acima do permitido e uma amostra apresentou Cd acima das quantidades aceitáveis.

A contaminação de suplementos alimentares por estes elementos é preocupante, mesmo em baixas concentrações uma vez que a exposição crônica pode causar graves efeitos deletérios à saúde.

REFERÊNCIAS

ABE-MATSUTO, L. T.; SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 7, p. 1371-1380, 2015.

ABIAD, O consumo de suplementos alimentares no Brasil, **Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Para Fins Especiais e Congêneres**, 30 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.radiojustica.jus.br/radiojustica/programacao!listarAudioRelacionado.action#>>. Acessado em: 18 nov. 2018.

AMSTER, E.; TIWARY, A.; SCHENKER, M.B. Case report: potential arsenic toxicosis secondary to herbal kelp supplement. **Environ Health Perspect**, v.115, p.606–608, 2007.

ANAWAR, H. M. Arsenic speciation in environmental samples by hydride generation and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.88, p. 30-42, 2012.

ANDRADE, R.M.; GOIS J. S.; TOALDO, I. M.; BATISTA, D. B.; LUNA, A. S.; BORGES, D. L. G. Direct Determination of trace elements in meat samples via High-resolution graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Analytic Methods**, v.10, p.1209-1215, 2017.

BELARRA, M. A.; RESANO, M.; RODRÍGUEZ, S.; URCHAGA, J.; CASTILHO, J. R. The use of chemical modifiers in the determination of cadmium in sewage sludge and tin in PVC by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta Part B**, 54, p. 787-795, 1999.

BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what fo and know?, **Trends Anal. Chem.**, p. 828-839, 2002.

BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C., Solid sampling in electrothermal atomic absorption spectrometry using commercial atomizers – A Review. **Journal Analytic At. Spectrom**, v.6, p.353-373, 1991.

BRASIL, Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Decreto referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/DECRETO%2BN%25C2%25BA%2B55.871%252C%2BDE%2B26%2BDE%2BMAR%25C3%2587O%2BDE%2B1965.pdf/59b8704c-52f4-481d-8baa-ac6edadf6490>> Acessado em: 14 junho 2018.

BRASIL, Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 jan. 1998. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI1NA%2C%2C>>. Acessado em: 15 abr. 2018.

BRASIL, RDC Anvisa nº 16, de 30 de abril de 1999. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de dezembro de 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RESOLUCAO_16_1999.pdf/66b77435-cde3-43ce-839f-f468f480e5e5>. Acessado em: 15 abr. 2018 (a).

BRASIL, RDC Anvisa nº 18, de 30 de abril de 1999. Dispõe sobre o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria.. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de maio de 1999. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0OQ%2C%2C>>. Acessado em: 15 abr. 2016 (b).

BRASIL, RDC Anvisa nº 19, de 30 de abril de 1999. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de maio de 1999. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI1MQ%2C%2C>>. Acessado em: 15 abr. 2016 (c).

BRASIL, Resolução Anvisa nº 22, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre os Procedimentos Básicos de Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Importados Pertinentes à Área de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 mar. 2000. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b6059200474581528da7dd3fbc4c6735/RESOLUCAO_22_2000.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 abr. 2018.

BRASIL, RDC Anvisa nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI1Mw%2C%2C>>. Acessado em: 16 abr. 2018.

BRASIL, RDC Anvisa nº 132, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 mar. 2003. Disponível em: <http://www.tifnet.com.br/informacoes_sobre_vigilancia_e_legislacao_sanitaria/Registro_de_produtos/RDC%20132%20-03%20Registro%20especificos.doc>. Acessado em: 16 abr. 2018.

BRASIL, Portaria nº 269, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 2000. Disponível em: <<http://coffito.gov.br/nsite/wp-content/uploads/2016/08/resoluo-rdc-n-269-2005-ingesto-diria-recomendada-idr-de-protenas-vitaminas-e-minerais.pdf>>. Acessado em: 16 abr. 2018.

BRASIL, RDC Anvisa nº 18, de 27 de abril de 2010. Aprova o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 abril 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/eb12e1804cc1568a88de9fc8a8d1b925/RDC+18_2010.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 17 abr. 2018 (a).

BRASIL, RDC Anvisa nº 27, de 06 de agosto de 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b951e200474592159a81de3fbc4c6735/DIRETORIA_COLEGIADA_27_2010.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 abr. 2018 (b).

BRASIL, Anvisa alerta risco de consumo de suplemento alimentar. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 10 jul. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+i+nteresse/noticias/anvisa+alerta+para+risco+de+consumo+de+suplemento+alimentar%20>>. Acesso em: 16 abr. 2018 (a).

BRASIL, Alimentos para Atletas. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/perguntas+frequentes/alimentos/b9423100434bbd628188aff30613c2e>>. Acessado em: 16 abr. 2018 (b)

BRASIL, RDC Anvisa nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acessado em: 16 abr. 2018.

BRASIL, O que é e para que serve o suplemento alimentar?. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13>>. Acessado em: 07 fev. 2018 (a).

BRASIL, Suplementos Alimentares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/suplementos-para-atletas/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US>. Acessado em: 07 fev. 2018 (b).

BRASIL, Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acessado em: 07 de fev. 2018 (c).

BRASIL, Produtos tradicionais. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/produtos-tradicionais/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US>. Acessado em: 07 fev. 2018 (d).

BRASIL, Novos alimentos e novos ingredientes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/novosalimentos>>. Acessado em: 07 fev. 2018 (e).

BRASIL, RDC Anvisa nº 98, de 1 de agosto de 2016. Dispõe sobre os critérios e procedimentos para o enquadramento de medicamentos como isentos de prescrição e o reenquadramento como medicamentos sob prescrição, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2921766/RDC_98_2016.pdf/32ea4e54-c0ab-459d-903d-8f8a88192412>. Acessado em: 01 jul. 2018 (f).

BRASNUTRI, Panorama do setor. **Associação Brasileira do fabricantes de suplementos nutricionais e alimentos para fins especiais**, 2016. Disponível em:

<http://www.brasnutri.org.br/arquivos/numeros_setor/09.03_panorama_2016_atualizado.pdf>
. Acessado em: 07 de fev. 2018.

BORGES, D. L. G; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U.; Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, n.18, p. 58-67, 2005.

CAMPOS, S. D.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; Suplementos alimentares para perda de peso: serão eficazes e seguros?. **Riscos e Alimentos**, n. 3, p. 28-29, 2012.

CARRERO, P.; MALAVÉ, A.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; RONDÓN, C. Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, 2001.

DEDINA, J.; TSALEV, D. L.; Hydride generation atomic absorption spectrometry; **John Wiley & Sons**, v. 130, England, 1995.

DERAVE W., TIPTON, K. D. Dietary Supplements for Aquatic Sports. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, 2014, v.24, p.437-449.

DONG, H. M.; KRIVAN, V. Direct solid-sampling electrothermal atomic absorption spectrometry methods for the determination of silicon in oxides of niobium, titanium and zirconium, **Spectrochim. Acta Part B**, 56, p. 1645-1656, 2001.

D'ULIVO, A.; Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes. Towards the clarification of most controversial aspects, **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 65, p. 360, 2010.

D'ULIVO, A.; MESTER, Z.; MEIJA, J.; STURGEON, R. E. Mechanism of Generation of Volatile Hydrides of traces elements by Aqueous Tetrahydroborate (III). Mass Spectrometric Studies on Reaction Products and Intermediates, **Anal. Chem.**, v. 79, p. 3008, 2007.

FENG, Y. L.; CHEN, H. Y.; TIAN, L. C.; NARASAKI, H., Off-Line Separation and determination of inorganic arsenic species in natural water by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry with hydride generation combined with reaction of arsenic (V) and L-cysteine, **Analytica Chimica Acta**, v.375, p.167-175, 1998.

FILIPIAK-SZOK, A.; KURZAWA, M.; SZLYK, E., Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 54-58, 2015.

FLORES, E. M.; SAIDELLES, A. P. F.; MULLER, E. I.; MATTOS, J. C. P.; PEREIRA, J. S. F. Determination of Cd and Pb in medicinal plants using solid sampling flame atomic absorption spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 89, p. 129-140, 2009.

FOWLER, B. A.; SELENE, C. H.; CHOU, J.; JONES, R. L.; CHEN, C. J. Arsenic, In **Handbook on the Toxicology of Metals**; Third Edition, Academic Press: Burlington, p. 367, 2007.

FRANK, J.; KRACHLER, M.; SHOTYK, W. Direct determination of arsenic in acid digest of plan and peat samples using HG-AAS and ICP-SF-MS, **Analytica Chimica Acta**, v. 530, p. 307-316, 2005.

FROES, R. E. S.; WINDMÖLLER, C. C.; DA SILVA, J. B. B. Emprego da modificação química permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, **Revista Analytica**, n.23, p.32, 2003.

GAO, **United States Government Accountability Office** , FDA Should Take Further Actions to Improve Oversight and Consumer Understanding, **United States Government Accountability Office**, Washington, US, 2009. Disponível em:<<http://www.gao.gov/new.items/d09250.pdf>>. Acessado em: 10 mar. 2018.

GULAY, S.; AYCAK, K.; YILDIZ, K. Determination of arsenic in *Helianthus annuus* L. by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, **Global Nest Journal**, n. 1, p. 140-147, 2015.

GUNDUZ, S.; AKMAN, S. Determination of lead in rice grains by solid sampling HR-CS GFAAS, **Food Chemistry**, v. 1441, p. 2634-2638, 2013.

HEDEGAARD, R. V.; ROKKJAER I.; SLOTH, J. J. Total and inorganic arsenic in dietary supplements based on herbs, other botanicals and algae—a possible contributor to inorganic arsenic exposure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.405, p.4429-4435, 2013.

HENDEN, E.; İSLEK, Y.; KAVAS, M.; YAYAYÜRÜK,O.; A study of mechanism of nickel interferences in hydride generation atomic absorption spectrometric determination of arsenic and antimony. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 793-798, 2011.

HOLAK, W.; Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry, **Anal. Chem.**, v. 41, p. 1712-1713, 1969.

HURD, D. T. **Chemistry of the Hydrides**. New York: John Willey and Sons Inc., p. 1-5, 1952.

JACKSON, K. W. **Electrothermal atomization for analytical atomic spectrometry**, John Willey & Sons, New York, 1999.

KINGSTON, H. M.; HASWELL, S. J.; **Microwave-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation**, 1st ed., American Chemical Society: Ohio, 1997.

KNAPP, G. Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration, In **Microchimica Acta** 2, p. 445-455, 1991.

KRAWCZYK, M., Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.88, p. 377–384, 2014.

KURFÜST, U.; PAWELS, J.; GROBECKER, K. H.; STOEPLER, M.; MUNTAU, H., Microhomogeneity study of BCR candidate reference material CRM 422 – Cod muscle, Fresenius, **Journal Anal. Chem.**, v.345, p. 112-120, 1993

KURFÜRST, U., **Solid sample analysis: direct and slurry sampling using GFAAS and ETV-ICP**, Ed Springer, Berlin, 1998.

LANGMYHR, F. J. The solid sampling technique of atomic absorption spectrophotometry-what can the method do? **Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 322, p. 654-656, 1985.

LEE, D. K.; CHOI, B. S., Effect of hydrochloric acid concentrations on the hydride generation efficiencies in ICP-AE, **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.10, p. 964-966, 1996.

MARRERO, J.; REBAGLIATI, R. J.; LEIVA, E.; LONDONIO, A.; SMICHOWSKI, P. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: Are the concentrations declared in the labels accurate?, **Microchemical Journal**, v. 108, pag. 81-86, 2013.

MATTOS, J. C. P; NUNES, A. M.; MARTINS, A. F.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Influence of citric acid as chemical modifier for lead determination in dietary calcium supplement samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 687-692, 2005.

MORETA, S.; PREVARIN, A.; TUBARO, F. Levels of creatine, organic contaminants and heavy metals in creatine dietary supplements. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1232-1238, 2011.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v.15, n.2, pag 119–129, 2004.

MUNIZ, D. H. F.; FILHO, E. C. O. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, p. 83-100, 2006.

NOGUEIRA, F. R. S.; BRITO, A. F.; VIEIRA, T. I.; OLIVEIRA, C. V. C.; GOUVEIA, R. L. B. Prevalência de uso de recursos ergogênicos em praticantes de musculação na cidade de João Pessoa, Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v.37, n.1, p. 56—64, 2015.

NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. **Química Nova**, v.31, p. 104-113, 2008.

PETURSDOTTIR, A. H.; FRIEDRICH, N.; MUSIL, S.; RAAB, A.; GUNNLAUGSDOTTIR, H.; KRUPP, E. M.; FELDDMANN, Hydride generation ICP-MS as a simple method for determination of inorganic arsenic in rice for routine biomonitoring, **Journal Analytical Methods**, v. 6, p. 5392, 2014.

RASMUSSEN, R. R.; HEDEGAARD, R. V.; LARSEN, E. H.; SLOTH, J. J. Development and validation of an SPE HG-AAS method for determination of inorganic arsenic in samples of marine origin. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 10, p.2825-2834, 2012

RÊGO, J. F.; VIRGILO, A.; NOBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A., Determination of lead in medicinal plants by High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry using direct solid sampling. **Talanta**, v.100, p. 21-26, 2012.

SCHLEMMER, G.; WELZ, B., Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, v.41, p.1157, 1986.

SÉBY, F.; GAGEAN, M.; GARRAUD, H.; CASTETBON, A.; DONARD, O. F. X. Desenvolvement os analytical procedures for determination of total chromium by HPLC-ICP-MS, in different materials used in the automotive industry, **Anal. Bional. Chem.** v. 377, p. 685-694. 2003.

SELENE, C. H.; CHOU, J.; JONES, R. L.; CHEN, C. J. In **Handbook on the Toxicology of metals**, Third Edition, Academic Press: Burlington, 2007. P. 367.

SILVA, L. F. M.; FERREIRA K. S. Segurança alimentar de suplementos alimentares comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 20, n. 5, 2014.

SINGH, A. P.; GOEL, R.K.; KAUR, T. K. Mechanisms pertaining to arsenic toxicity, *Toxicology Internacional*, v. 18, p. 87, 2011.

SMICHOWSKI, P.; LONDONIO, A. The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: A review, *Microchemical Journal*, v.136, p. 113–120, 2018.

SOUZA, J. M. O.; CARNEIRO, M. F. H.; PAULELLI, A. C. C.; GROTTTO, D.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; BARBOSA JÚNIOR, F.; BATISTA, B. L. Arsênio e arroz: toxicidade, metabolismo e segurança alimentar, **Química nova**, v.38, p.118, 2015.

STRIPEIKIS, J.; TUDINO, M.; TROCCOLI, O.; WUILLOUD, R.; OLSINA, R.; MARTINEZ, L.; On-line copper and iron removal and selenium (VI) pre-reduction for the determination of total selenium by flow-injection hydride generation-inductively coupled plasma optical emission spectrometry, **Spectrochim. Acta, part B**, v.56, p.93-100, 2001.

SZOK, A. F.; KURZAWA M.; SZLYK E. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.30, p. 54-58, 2015.

TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P.; CAMPOS, R. C. D., A geração química de vapor em Espectrometria de Absorção Atômica, **Química Nova**, v.25, p. 1132, 2002.

TINAS, H.; OZBEK, N.; AKMAN, S. Determination of lead in flour samples directly by solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta B**, n. 140, p. 73-75, 2018.

UDOUSORO, I.; IKEM, A.; AKINBO, O. T., Content and daily intake of essential and potentially toxic elements from dietary supplements marketed in Nigeria, **Journal of Food Composition and Analysis**, v.62, p. 23–34, 2017.

US, UNITED STATES, Dietary Supplements, **Food and Drug Administration**, US, 2016. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/usingdietarysupplements/ucm480069.htm#what_is>. Acessado em: 07 fev. 2018.

USP, UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <233>, Elemental Impurities – Procedures, USP 40-NF 35, 2017 a.

USP, UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <1225>, Validation of compendial procedures, USP 40-NF 35, 2017 b.

USP, UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <852>, Atomic Absorption Spectroscopy, USP 40-NF 35, 2017 c.

USP, UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <2232>, Elemental Contaminants in Dietary Supplements, USP 40-NF 35, 2017d.

VIRGILIO, A.; RÊGO, J. F.; BARROS, A. I.; GOMES NETO, J. A. Determination of Cd, Ni and V in Spices by Solid Sampling High- Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 1988-1993, 2015.

VOGUEL, A.I., **Química Analítica Qualitativa**, 5ª ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WELZ, B.; MELCHER, M. Mechanisms of Transition Metal Interferences in Hydride Generation Atomic-absorption Spectrometry. Part 3 – Releasing Effect of Iron (III) on Nickel Interference on Arsenic and Selenium. **Analyst.**, v. 109, p.577-579, 1984.

WELZ, B.; SPERLING, M.; **Atomic Absorption Spectrometry**, 3ªed., Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

WELZ, B.; ROSS, H. B.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R.; High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry- What can we expect? **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, p.220-229, 2003.

WELZ, B.; MORÉS, S.; CARASEK, E.; GORETI, R. M.; OKRUSS, M.; BECKER-ROSS, H.; High-Resolution Continuum Source Atomic and Molecular Absorption Spectrometry—A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.45, p.327-354, 2010.