

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

Gabriela Camera Leal

**DETERMINAÇÃO DE CD E PB POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES
OLEOSOS APÓS EXTRAÇÃO POR QUEBRA DE EMULSÃO**

Santa Maria, RS
2023

Gabriela Camera Leal

**DETERMINAÇÃO DE CD E PB POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES OLEOSOS APÓS EXTRAÇÃO
POR QUEBRA DE EMULSÃO**

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

Orientadora: Dr^a Carine Viana Silva

Santa Maria, RS
2023

Gabriela Camera Leal

**DETERMINAÇÃO DE CD E PB POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES OLEOSOS APÓS EXTRAÇÃO
POR QUEBRA DE EMULSÃO**

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

Aprovado em 26 de abril de 2023:

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

Ricardo Bizogne Souto, Dr (UFBA)

Sérgio Mortari, Dr (UFN)

Liziane Maahs Flores, Dra (UFSM)

Simone Noremberg Kunz, Dra (UFSM)

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Leal, Gabriela
DETERMINAÇÃO DE CD E PB POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES OLEOSOS APÓS
EXTRAÇÃO POR QUEBRA DE EMULSÃO / Gabriela Leal.- 2023.
76 p.; 30 cm

Orientadora: Carine Viana Silva
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2023

1. Extração de metais 2. Suplementos alimentares
oleosos 3. HR CS GFAAS 4. EIEB I. Viana Silva, Carine
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, GABRIELA LEAL, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por tudo o que Ele representa na minha vida e a minha família, que me inspiraram e sempre me incentivaram a busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo;

A minha orientadora, Prof. Dra. Carine Viana Silva, por todo conhecimento compartilhado, confiança, paciência e constante orientação ao longo do caminho.

Aos meus pais, pela imensa dedicação, amor e compreensão, por sempre me acompanhar com bons pensamentos;

A minha filha Bianca e ao meu marido 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 esse trabalho. Em especial as amigas Patricia e Rejane que sempre me apoiaram com muito carinho.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse 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 CD E PB POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES OLEOSOS APÓS EXTRAÇÃO POR QUEBRA DE EMULSÃO

AUTORA: Gabriela Camera Leal
ORIENTADORA: Carine Viana Silva

Os suplementos alimentares são obtidos de forma sintética e derivados de plantas, podendo ocorrer a contaminação de metais devido ao ambiente industrial, características geoquímicas do solo, entre outras formas. Neste trabalho é descrito um método para a determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em suplementos alimentares oleosos usando a extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) e espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua equipado com forno de grafite (HR CS GFAAS). O método de preparação das amostras baseia-se na formação de uma emulsão água/óleo pela adição de uma solução extratora composta por 5% de Triton X-100 e 15% de ácido clorídrico (HCl) à amostra de óleo diluída com 1,5 mL de tolueno e quebra desta emulsão por centrifugação (4000 rpm por 5 minutos). Duas fases bem definidas foram formadas e a fase aquosa ácida contendo os íons extraídos de Cd e Pb foi analisada por HR CS GFAAS. Diferentes parâmetros que influenciam a eficiência de extração de Cd e Pb foram otimizados univariadamente. Um método de calibração baseado em matriz foi aplicado para compensar a interferência causada pelos efeitos da matriz. A precisão, expressa como desvio padrão relativo, foi de menor que 11% para o Pb e menor que 7 % para o Cd. Os limites de detecção foram 3,32 µg/Kg para Pb e 1,51 µg/Kg Cd. A exatidão dos métodos foi avaliada por meio de testes de adição e recuperação de analito utilizando a amostra de suplemento com óleo de cártamo preparada pelo procedimento de emulsão, e os valores obtidos apresentaram intervalo de confiança entre 94,65-108,41% com Pb e 100,8-106,1% com Cd. Os parâmetros de desempenho dos métodos estavam de acordo com as normas da Farmacopeia Americana para análise inorgânica em suplementos alimentares. A quantidade de chumbo e cádmio foram determinadas em 9 suplementos alimentares oleosos disponíveis no mercado brasileiro. A concentração de Cd variou de 8,81 a 9,35 µg/Kg e a maior concentração de Pb foi de 19,91 µg/Kg. A proposta de preparo de amostra por quebra de emulsões de suplementos alimentares oleosos mostrou ser uma estratégia simples e eficiente para avaliar a qualidade de suplementos oleosos quanto a concentração de Pb e Cd determinada por HR CS GFAAS.

Palavra-chave: Metais, Suplementos Oleosos, Emulsão, Espectrometria atômica.

ABSTRACT

DETERMINATION OF Cd E Pb BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY IN OIL FOOD SUPPLEMENT AFTER EMULSION BREAKAGE EXTRACTION

AUTHOR: Gabriela Camera Leal
ADVISOR: Carine Viana Silva

Food supplements are obtained synthetically and derived from plants, and metal contamination may occur due to the industrial environment, soil geochemical characteristics, among other forms. In this work, a method for the determination of cadmium (Cd) and lead (Pb) in oily food supplements is described using emulsion breakage-induced extraction (EIEB) and continuous source high resolution atomic absorption spectrometry equipped with a graphite furnace. (HR CS GFAAS). The sample preparation method is based on the formation of a water/oil emulsion by adding an extractor solution composed of 5% Triton X-100 and 15% hydrochloric acid (HCl) to the oil sample diluted with 1.5 mL of toluene and break this emulsion by centrifugation (4000 rpm for 5 minutes). Two well-defined phases were formed and the acidic aqueous phase containing the extracted Cd and Pb ions was analyzed by HR CS GFAAS. Different parameters that influence the extraction efficiency of Cd and Pb were univariately optimized. A matrix-based calibration method was applied to compensate for interference caused by matrix effects. Precision, expressed as relative standard deviation, was less than 11% for Pb and less than 7% for Cd. The detection limits were 3.32 $\mu\text{g/Kg}$ for Pb and 1.51 $\mu\text{g/Kg}$ Cd. The accuracy of the methods was evaluated by means of analyte addition and recovery tests using the safflower oil supplement sample prepared by the emulsion procedure, and the values obtained showed a confidence interval between 94.65-108.41% with Pb and 100.8-106.1% with Cd. The performance parameters of the methods were in accordance with the American Pharmacopoeia standards for inorganic analysis in food supplements. The amount of lead and cadmium were determined in 9 oily food supplements available in the Brazilian market. The Cd concentration ranged from 8.81 to 9.35 $\mu\text{g/Kg}$ and the highest Pb concentration was 19.91 $\mu\text{g/Kg}$. The proposed sample preparation by breaking emulsions of oily dietary supplements proved to be a simple and efficient strategy to assess the quality of oily supplements in terms of Pb and Cd concentration determined by HR CS GFAAS.

Keyword: Metals, Oily Supplements, Emulsion, Atomic Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas metabólicas dos ácidos graxos poli-insaturados.	20
Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de emulsão: a) (O/A), onde gotículas de óleo estão dispersas em água (fase contínua) e b) (A/O), onde gotículas de água estão dispersas em óleo (fase contínua).	31
Figura 3- Representação esquemática dos principais componentes de um espectrômetro de HR-CS AAS. Adaptado de Welz et al, 2005.....	36
Figura 4 - Efeito do solvente empregado na diminuição da viscosidade do óleo utilizado na extração de Cd e Pb. As barras de erro representam o desvio padrão de três medidas.	44
Figura 5 - Comparação das absorvâncias após EIEB utilizando HNO ₃ , HCl e HOAc como ácidos extratores em amostra enriquecida de suplementos oleosos. As barras de erro representam o desvio padrão de três medidas.	46
Figura 6 - Efeito da concentração de HCl na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de Triton X-100 = 10% m/v.	47
Figura 7 - Efeito da concentração de Triton X-100 na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v.	48
Figura 8 - Efeito do tempo de banho de ultrassom na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v e TX-100 5% m/v.	49
Figura 9 - Efeito do tempo do tempo de aquecimento na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v e TX-100 5% m/v.	50
Figura 10 - Efeito do tempo de centrifugação na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v e TX-100 5% m/v.	51
Figura 11 - Curvas de atomização e pirólise para o chumbo em solução padrão aquosa (X) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão com 0,05% Mg(NO ₃) ₂ /0,1% Pd(NO ₃) ₂ ; (▲) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão sem modificador; (●) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida com 0,05% Mg(NO ₃) ₂ /0,1% Pd(NO ₃) ₂ ; ; (■) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida sem modificador.	53
Figura 12 - Curvas de atomização e pirólise para o cádmio em solução padrão aquosa (X) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão com 0,05% Mg(NO ₃) ₂ /0,1% Pd(NO ₃) ₂ ; (▲) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão sem modificador; (●) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida com 0,05% Mg(NO ₃) ₂ /0,1% Pd(NO ₃) ₂ ; ; (■) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida sem modificador.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para suplementos alimentares.....	17
Tabela 2 - Programa de temperatura aplicado na análise das emulsões, nas linhas analíticas 217,0005 nm e 228,8018 nm, para o Pb e o Cd respectivamente.....	38
Tabela 3 - Características das amostras de suplementos alimentares oleosos em estudo.	39
Tabela 4 - Programa de temperatura aplicado na análise das emulsões, nas linhas analíticas 217,0005 nm e 228,8018 nm, para o Pb e o Cd respectivamente.....	43
Tabela 5 - Curvas de calibração com padrão inorgânico utilizando o método de calibração por matrização e calibração externa em HR-CS GF AAS.....	55
Tabela 6 - Figuras de mérito para determinação de Cd e Pb em suplementos oleosos usando HR-CS GF AAS.	57
Tabela 7 - Resultados de exatidão do método proposto para determinação de chumbo em amostras de suplementos alimentares.....	58
Tabela 8 - Concentração de cádmio e chumbo em suplementos alimentares oleosos pelo método proposto.	59
Tabela 9 - Resultado obtidos na análise de suplementos alimentares oleosos pelo método de preparo proposto e por digestão ácida. As concentrações ($\mu\text{g/g}$) dos analitos são expressas como a média \pm desvio padrão ($n=3$).	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AHPA	<i>American Public Health Association</i>
ALA	Ácido Alfa Linolênico (do inglês, <i>Alpha Linolenic Acid</i>)
CE	Comissão Europeia
CCD	Dispositivo de carga acoplada (do inglês, <i>Charge-Coupled Device</i>)
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DDR	Dose Diária Recomendada
DHA	Ácido Docosahexaenoico (do inglês, <i>Docosahexaenoic Acid</i>)
DPA	Ácido Docosapentaenoico (do inglês, <i>Docosapentaenoic Acid</i>)
EPA	Ácido Eicosapentaenoico (do inglês, <i>Eicosapentaenoic Acid</i>)
EIEB	Extração Induzida por Quebra de Emulsão (do inglês, <i>Extraction Induce by Emulsion Breaking</i>)
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (do inglês, <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês, <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GLA	Ácido Gama Linolênico (do inglês, <i>Gamma Linolenic Acid</i>)
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (do inglês, <i>High Density Lipoprotein</i>)
HGAAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês, <i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HR CS GFAAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua equipado com forno de grafite (do inglês, <i>High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</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 (do inglês, <i>Line Source Atomic Absorption Spectrometry</i>)
LSBC	Correção de fundo por mínimos quadrados (do inglês, <i>Least squares background correction</i>)
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês, <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limits of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limits of quantification</i>)

OMS	OMS (Organização Mundial da Saúde)
PDE	Exposição Diária Permitida (do inglês, <i>Permitted Daily Exposure</i>)
PUFA	Ácidos Graxos Poli-Insaturados (do inglês, <i>Poli Unsaturated Fatty Acid</i>)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TS-FFAAS	Espectrometria de absorção atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol (do inglês <i>Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
USP	Farmacopeia Americana (do inglês, <i>United States Pharmacopeia</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo geral	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES	17
2.2	SUPLEMENTOS ALIMENTARES oleosos.....	18
2.3	COMPOSIÇÃO DOS SUPLEMENTOS OLEOSOS	19
2.4	IMPUREZAS ELEMENTARES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES	23
2.4.1	Toxicidade e contaminação do chumbo em suplementos alimentares	24
2.4.2	Toxicidade e contaminação do cádmio em suplementos alimentares	25
2.5	Contaminação de Pb e Cd em óleos vegetais comestíveis	27
2.6	MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS OLEOSAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	28
2.6.1	Digestão ácida ou mineralização	28
2.6.2	Diluição com solvente orgânico	30
2.6.3	Emulsão	31
2.7	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	34
2.7.1	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua acoplado ao forno de grafite	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	37
3.2	PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO	38
3.3	AMOSTRAGEM	38
3.4	REAGENTES E SOLUÇÕES	39
3.5	PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO 40	
3.6	DIGESTÃO ÁCIDA PARA DETERMINAÇÃO DE PB E CD POR HR GF-AAS	40
3.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	41
3.7.1	Exatidão	41
3.7.2	Precisão	41
3.7.3	Linearidade e faixa de concentração	41
3.7.4	Limites de quantificação e detecção	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	42
4.1.1	Avaliação da influência do tipo de solvente empregado para diluir as amostras ...	43
4.1.2	Avaliação da influência da natureza e concentração do ácido empregado na extração dos metais	45
4.1.3	Avaliação da influência da concentração do Triton X-100 empregado na extração dos metais	47

4.1.4 Avaliação da influência do banho de ultrassom empregado na extração dos metais	48
4.1.5 Avaliação do aquecimento e da centrifugação empregado na extração dos metais	49
4.2 PROGRAMA DE TEMPERATURA	51
4.3 FIGURAS DE MÉRITO	54
4.4 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA.....	58
5 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE A – ARTIGO 1	74

1 INTRODUÇÃO

Suplemento alimentar é definido todo produto apresentado em formas farmacêuticas e destinado a suplementar a alimentação de pessoas saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos. No Brasil o órgão responsável pela regulamentação destes produtos é Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL,2018).

De uma maneira geral, tem se observado um aumento prenunciado no consumo de suplementos alimentares nas últimas décadas. Esta maior preocupação nas questões nutricionais, levanta questões científicas acerca dos benefícios e malefícios do uso da suplementação (WEBER *et al.*, 2018; DOS SANTOS, OLIVEIRA, CHAVES, 2023; SILVA *et al.*, 2022). O consumo de suplementos oleosos tem sido amplamente promovido pela mídia para diversas finalidades como melhora do perfil lipídico, proteção cardiovascular, combate ao estresse e depressão, além de outros importantes efeitos à saúde (LETRO *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2021). Apesar dos inúmeros efeitos benéficos comprovados dos suplementos alimentares, se contrapõem os efeitos tóxicos, que apesar de pouco elucidados por estudos científicos, podem acarretar em consequências na saúde do indivíduo. Ademais, alguns estudos demonstram falta de qualidade desses produtos, tanto com adulterações intencionais com substâncias químicas proibidas para esta categoria, como também por contaminações inorgânicas (WHITE, 2022; MUSCHIETTI, REDKO, ULLO, 2020).

Em 2018, a Anvisa publicou a primeira resolução específica sobre suplementos alimentares, categoria de produtos que até então não existia nomenclatura no Brasil. Produtos que estavam enquadrados em outros grupos de alimentos, como alimentos para atletas, alimentos para gestantes e suplementos vitamínicos foram incluídos nesta norma. A agência sanitária definiu regras mais adequadas, incluindo limites mínimos e máximos de constituintes, populações indicadas, compostos autorizados e alegações com comprovação científica. Os suplementos alimentares em geral foram definidos como produtos dispensados de registro sanitário, porém aqueles contendo enzimas ou probióticos possuem obrigatoriedade de registro sanitário para comercialização. Em geral os suplementos alimentares são classificados como alimentos, sendo que sua produção e controle de qualidade dependem única e exclusivamente do produtor, sem a necessidade de autorização prévia para a comercialização do produto (BRASIL, 2018).

As regulamentações sanitárias brasileiras não estabelecem limites de contaminantes inorgânicos especificamente para suplementos alimentares. Todavia, a Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa nº 243 de 2018 define que na ausência de uma legislação brasileira, o

Compêndio de Suplementos Alimentares da Farmacopeia Americana pode ser seguido (BRASIL, 2018). A Farmacopeia Americana (USP, do inglês *United States Pharmacopeia*) define limites de cádmio (5 µg/dia) e chumbo (10 µg/dia) nesta categoria de produtos (USP, 2017 d).

A contaminação inorgânica de suplementos alimentares pode ser oriunda de diversas fontes, e a falta de controle na produção e de controle sanitário da comercialização são os fatores determinantes para que estes produtos cheguem desta forma ao consumidor. A contaminação dos suplementos alimentares não é previsível e pode ocorrer de forma cumulativa ao longo de todo o processo de produção. Diversos fatores podem acarretar na contaminação do produto, como o ambiente pode conter poluentes antropogênicos, as matérias primas utilizadas nas formulações podem já estar com certa carga de contaminação inorgânica, o próprio processo de manipulação e produção, ou mesmo o armazenamento inadequado de embalagens e do produto final. Desta forma, é necessário monitorar a quantidade em que alguns elementos estão presentes, uma vez que mesmo em concentrações baixas, devido a ingestão diária, podem causar efeitos deletérios ao consumidor (SZOK; KURZAWA; SZLYK, 2015; VAREDA, VALENTE, DURÃES, 2019).

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para a determinação de elementos traço em amostras sólidas e líquidas, no entanto existem poucos estudos com amostras oleosas, devido à complexidade da matriz (GAB-ALLAH *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2022). A complexidade da matriz, faz com que o preparo da amostra seja provavelmente a fase mais crítica na determinação de metais em suplementos alimentares oleosos. Muitos procedimentos vêm sendo empregados corriqueiramente para o tratamento das amostras para a extração do analito, no entanto um método de preparo de amostra proposto para determinação de elementos traço em amostras oleosas é o método por quebra de emulsão.

A quebra de emulsão é baseado na formação de uma emulsão de óleo com surfactante e ácido e sua posterior quebra por aquecimento ou centrifugação com formação de duas fases, uma fase orgânica e outra fase aquosa. Devido a maior afinidade dos íons metálicos com a fase aquosa ácida, estes se concentram nesta fase podendo ser determinados por diferentes técnicas analíticas (LEITE *et al.*, 2018).

Tendo em vista a necessidade da determinação de elementos tóxicos como Cd e Pb em amostras de suplementos alimentares oleosos, sem o uso de elevados volumes de ácidos concentrados e sem o risco de perda de analitos por volatilização, torna-se necessário a busca por um método para o preparo dessas amostras que seja adequado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver métodos analíticos para a determinação de Cd e Pb em amostras de suplementos alimentares oleosos utilizando quebra de emulsão como técnica de preparo de amostra e quantificação através de HR CS GF AAS.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver um método simples e rápido para o preparo de amostras utilizando a quebra de emulsão para a determinação de Cd e Pb;
2. Desenvolver e validar métodos para a determinação de Cd e Pb por HR CS GFAAS em suplementos alimentares após preparo de amostra;
3. Aplicar os métodos validados para a determinação Cd e Pb por HR CS GFAAS com as amostras de suplementos alimentares oleosos após preparo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Na legislação brasileira, o órgão responsável pela regulamentação de produtos como os suplementos alimentares é a Anvisa. A legislação brasileira define os suplementos alimentares como todo produto apresentado em formas farmacêuticas e destinado a suplementar a alimentação de pessoas saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos. Em 2018, a agência criou esta categoria de produtos e publicou as primeiras normas para suplementos alimentares com o objetivo de melhorar o acesso dos consumidores brasileiros a produtos seguros e de qualidade, diminuir o desnível de informações observado, além de aprimorar o controle sanitário (BRASIL, 2018). O conjunto de normas que foram considerados como um marco regulatório dos suplementos alimentares é formado por seis resoluções, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para suplementos alimentares.

Normas Anvisa	Ementas
RDC 239/2018	Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares.
RDC 240/2018	Categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário.
RDC 241/2018	Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.
RDC 242/2018	Regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como medicamentos específicos.
RDC 243/2018	Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares.
Instrução Normativa 28/2018	Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares.

Fonte: adaptado de Anvisa (2018)

Certos países estabelecem limites de contaminantes inorgânicos para os suplementos alimentares, como por exemplo a Farmacopeia Americana (USP), a Comissão Europeia (CE) e o *Codex Alimentarius*. No Brasil, a Anvisa não definiu limites de contaminantes inorgânicos para os suplementos alimentares, no entanto, na ausência de uma regulamentação brasileira, os compêndios internacionais podem ser seguidos (BRASIL, 2018).

A CE estabelece no seu Regulamento nº 629/2008 os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios e é estabelecido os seguintes teores máximos de contaminantes em suplementos alimentares: 1,0 µg/g de cádmio, 3,0 µg/g de chumbo e 0,10 µg/g de mercúrio (CE, 2008).

O *Codex Alimentarius* é um programa conjunto da FAO (do inglês, *Food and Agriculture Organization*) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), criado em 1963, que estabelece normas internacionais de produtos da área de alimentos, diretrizes e guias de boas práticas e de avaliação de segurança. Por exemplo para os óleos vegetais são estabelecidos os limites de 0,08 µg/g de chumbo e 0,1 µg/g de arsênio (CODEX STAN, 2010).

A USP estabelece limites de contaminantes inorgânicos para os suplementos alimentares e define metodologia descrita em seu Capítulo 2232. A exposição diária permitida de chumbo e cádmio em suplementos alimentares pela farmacopeia americana é de 10 µg/dia e 5 µg/dia, respectivamente, sendo que a exposição diária permitida (PDE) é calculada pelo peso corporal de 50 kg (USP, 2017).

2.2 SUPLEMENTOS ALIMENTARES OLEOSOS

A alimentação deve fornecer os nutrientes para a manutenção das funções vitais e garantir a energia para exercer as atividades diárias, mantendo o equilíbrio corporal. A dieta humana depende da ingestão de macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios) e de micronutrientes (vitaminas, minerais, antioxidantes, entre outros). Uma boa saúde depende parcialmente, de uma adequada e balanceada ingestão desses componentes (NYARADI *et al.*, 2013; DOMINGUES *et al.*, 2022).

Entretanto, grande parte da população consome alimentos com baixo teor de fibras e de gorduras insaturadas, mas ricos em açúcares e em gorduras saturadas. Diante disso, a indústria de suplementos alimentares está em expansão no desenvolvimento de produtos com ingredientes bioativos que exerçam funções benéficas para o organismo. Estes nutrientes desencadeiam efeitos metabólicos e fisiológicos ao organismo, podendo desempenhar importante papel na prevenção de doenças crônicas (COSTA *et al.*, 2020).

O consumo de suplementos oleosos tem sido amplamente promovido pela mídia para exercer funções como auxiliar a perda de peso, melhora do perfil lipídico, além de outros efeitos à saúde.

Os suplementos alimentares na forma farmacêutica de cápsula oleosa se apresentam, em sua maioria, na forma cápsulas de gelatina mole. A cápsula é uma apresentação farmacêutica formada por um envoltório de gelatina ou celulose que protegem o óleo da oxidação e deterioração, além de facilitar a administração e transporte do produto pelo consumidor (BAHMANI *et al.*, 2015; FERNANDO *et al.*, 2015; ULLAH *et al.*, 2016).

Dentre os componentes dos suplementos alimentares oleosos destacam-se os óleos de cártamo, ômega 3 e 6, linhaça, óleo gergelim, óleo de peixe, óleo de borragem, óleo de girassol, além da vitamina E.

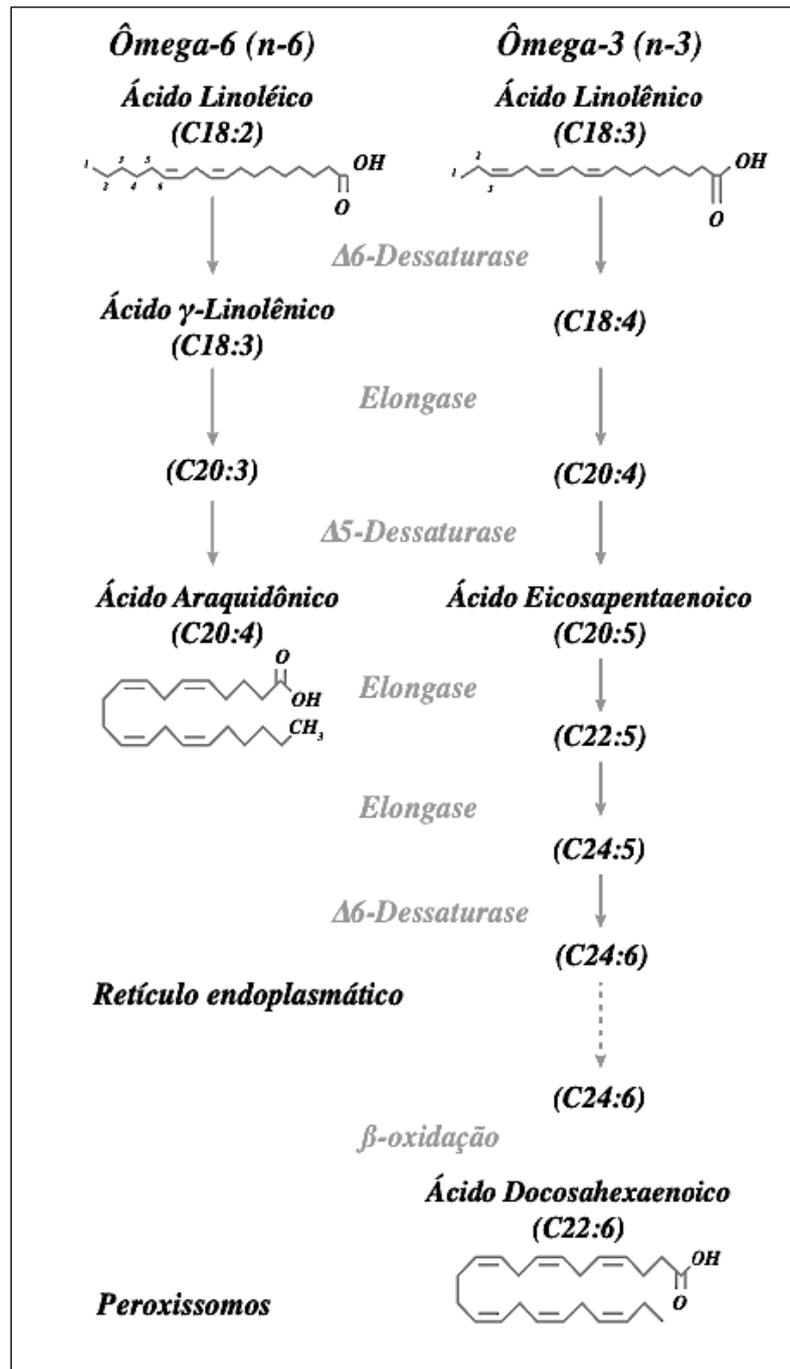
2.3 COMPOSIÇÃO DOS SUPLEMENTOS OLEOSOS

Os ácidos graxos (AGs) são ácidos carboxílicos que geralmente apresentam uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com o número par de átomos de carbono. Os AGs podem ser classificados como saturados, quando não possuem insaturações (duplas ligações) em sua cadeia carbônica e insaturados, quando apresentam em sua cadeia uma ou mais insaturações (SANTOS *et al.*, 2020).

Os AGs são produtos sintetizados pelo ser humano, de acordo com sua necessidade orgânica, com exceção dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, do inglês *Poli Unsaturated Fatty Acid*) que são considerados ácidos graxos essenciais (AGE), uma vez que não são sintetizados de forma endógena, sendo obtidos através da dieta (MORI, 2017).

Uma vez ingeridos, os PUFAs de cadeia curta são convertidos em ácidos graxos de cadeia longa, conforme pode ser observado na Figura 1. A síntese de ácidos graxos de cadeia longa (LC-PUFAs) ocorre principalmente no fígado, cérebro, coração e pulmões (HAWKEY, NIGG, 2014). Dentre os ácidos graxos essenciais, os principais são os PUFAs ômega 3 (ALA, 18:3n-3) e ômega 6 (AL, 18:2n-6).

Figura 1 - Etapas metabólicas dos ácidos graxos poli-insaturados.



Fonte: adaptado de Calder e colaboradores (2003).

Os ácidos graxos ômega 6 são encontrados principalmente em óleos vegetais, ovos e carnes, estando amplamente presente na nossa dieta. Sua importância maior se dá em sua atuação no sistema imunológico, uma vez que seu composto natural, o ácido linoleico (AL), de 18 carbonos, tem como seu sucessor metabólico o ácido araquidônico (AA), de grande relevância fisiológica e precursor das prostaglandinas (MORI, 2017; GRANDINI *et al.*, 2020).

Os PUFAs da série ômega 3 estão principalmente presentes em óleos de peixe, algas e linhaça. Dentre estes, destacam-se, pela inerente importância fisiológica, o ácido alfa-linolênico (ALA), de 18 carbonos, o ácido eicosapentaenoico (EPA), de 20 carbonos, e o ácido docosahexaenoico (DHA), de 22 carbonos (CALDER, 2017). Pequenas quantidades de EPA e DHA podem ser sintetizadas no corpo usando ALA, encontrado em plantas como linhaça, canola e nozes (LETRO *et al.*, 2022).

O óleo de peixe tem vários benefícios, muitos ligados à ação antioxidante e anti-inflamatória. Alguns estudos associam o consumo de suplementos de óleos de peixe com a melhora da saúde musculoesquelética em idosos, além dos efeitos anti-inflamatórios conhecidos por reduzir a lesão oxidativa (RUSS *et al.*, 2020).

Dentre os benefícios do grupo de ácidos graxos ômega 3, podemos destacar a prevenção de doenças cardiovasculares, através do combate aos marcadores inflamatórios, impedindo a progressão da lesão aterosclerótica (NASCIMENTO, SCALABRINI, 2020; FERNANDES *et al.* 2021). A capacidade de redução da formação de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com câncer podem retardar a evolução dos tumores, contribuindo para um prognóstico favorável (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006; VAZ *et al.*, 2014). A suplementação com ômega-3 promove melhora sobre os parâmetros do diabetes, como redução da glicemia de jejum e da resistência à insulina (DELPINO *et al.*, 2021). Estudos clínicos também relatam efeitos protetores dos n-3 PUFAs na doença de Alzheimer, capacidade de aprendizado, sintomas depressivos, transtorno bipolar e doenças autoimunes (VAZ *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2021).

O óleo de cártamo é extraído das sementes do *Carthamus Tinctoriu* L. e contém alto valor dietético (KOYAMA *et al.*, 2006; ABUD *et al.*, 2010; SANTANA *et al.*, 2017). As sementes de cártamo são ricas em um óleo no qual predominam ácidos graxos de cadeia média, com ácidos do tipo mono e poli-insaturados (90%), sendo composto principalmente pelo ácido oleico (20-30%) e ácido linoleico (55-88%), gorduras do tipo ômega 9 e 6 (SCHULZE *et al.*, 2014). O óleo de cártamo é fonte de α -tocoferóis, apresentando assim potencial antioxidante (VOSOUGHKIA *et al.*, 2011).

A composição do óleo de cártamo estimulou pesquisas com a finalidade de demonstrar que a suplementação dietética com este nutriente poderia ter efeito positivo no perfil lipídico e também desempenhar um papel antiaterogênico. Estudos demonstraram uma melhoria do perfil lipídico, com aumento das concentrações de HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) (ASP *et al.*, 2011) e ação hepatoprotetora (WU *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2015.). Entretanto, há relatos conflitantes, pois a sua utilização gerou efeitos deletérios sobre o perfil lipídico em um

estudo com modelo experimental de síndrome metabólica, com elevação do colesterol sérico total e de sua fração mais aterogênica (LDL-c). Como resultado, também ocasionou esteatose hepática, indicando que o uso de óleo de cártamo possa ter efeitos deletérios no perfil lipídico e na saúde (SANTANA *et al.*, 2017).

O óleo de cártamo também é consumido como suplemento dietético para emagrecer, diminuir a gordura corporal e aumentar a massa muscular, embora estudos clínicos não comprovem esse benefício. Na literatura, são descritos casos de insuficiência hepática aguda induzidos pelo consumo excessivo de óleo de cártamo com esta finalidade, onde os desfechos clínicos foram a submissão dos pacientes à transplante hepático (DE ATAIDES *et al.*, 2018).

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.) possui ácidos graxos poli-insaturados, fibras, compostos fenólicos, antioxidantes e outros bioativos, que lhe coloca na condição de alimento funcional. Na sua composição, o óleo de linhaça apresenta predominância de ácidos graxos insaturados (95,1%), sendo o de maior concentração o ácido linolênico (53,58%), seguido do oleico (25,98%), linoleico (15,54%). A riqueza em ácidos graxos ômega-3 proporciona propriedades funcionais relacionadas à redução do colesterol total, do LDL-colesterol, dos triglicerídeos, das doenças cardiovasculares, além de exercer efeitos anti-inflamatórios (COSTA *et al.*, 2020; MOHAMED, DIAAELDIN, SHERIF, 2021).

O óleo de gergelim (*Sesamum indicum* L.) apresenta componentes bioativos incluindo gorduras poli-insaturadas, fitoesteróis, ligninas, vitaminas, tocoferóis, minerais e aminoácidos como metionina, valina e triptofano (ANDARGIE *et al.*, 2021). O óleo de gergelim contém uma alta porcentagem de ácidos graxos (85%) e dois constituintes menores, a sesamina e sesamolina. Além do óleo, as sementes de gergelim também possuem alto percentual de proteínas dietéticas (ricas em metionina), carboidratos, vitamina E, além de minerais. É caracterizado por várias propriedades, incluindo antiproliferação, efeitos pró-apoptose, anti-inflamatórios, efeitos antimetastáticos, antiangiogênicos e pró-angiogênicos, pró-autofagocíticos e potencial antioxidante (YASEEN *et al.*, 2021).

O óleo de girassol, obtido da semente da planta *Helianthus annuus* L., da família Compositae, destaca-se por ser a quarta oleaginosa em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo. O óleo de girassol é interessante pelo seu conteúdo em ácido linoleico, possui uma combinação de gorduras monoinsaturadas e poli-insaturadas com baixos níveis de gorduras saturadas e é fonte dietética de PUFA n-6. Além de leve no sabor e aparência, fornece mais vitamina E do que qualquer outro óleo vegetal (RAMIREZ-TORTOSA *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2021). O consumo do óleo tem sido associado com os efeitos positivos sobre a saúde humana, devido à ácidos graxos específicos, que possuem os benefícios

cardiovasculares, como reconhecidas funções de hidratação e reestruturação, sendo utilizado no tratamento do colesterol e prevenção da aterosclerose (CASTRO *et al.*, 2021).

A semente de borragem (*Borago officinalis* L.) é uma fonte rica de ácido gama-linolênico (GLA, 26-38%), mas também é uma fonte importante de outros PUFAs, como ácido linoleico (35-38%) e ácido oleico ômega-9 (16-20%). O seu óleo é reconhecido pelo potencial na terapia de doenças inflamatórias crônicas, como dermatite atópica (eczema), artrite reumatoide, câncer, aterosclerose, entre outras (ARANAZ *et al.*, 2020; TANWAR, GOYAL, 2021).

A vitamina E é um nutriente antioxidante lipossolúvel essencial, necessário em pequenas quantidades para processos biológicos importantes (CUSTÓDIO *et al.*, 2020). A vitamina E refere-se a compostos lipossolúveis, incluindo quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, sendo o α -tocoferol a forma biologicamente mais disponível e mais conhecida (HIGGINS, IZADI, KAVIANI, 2020). A vitamina E é um antioxidante solúvel em gordura que pode proteger os PUFAs da oxidação, regula a produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (LEE, HAN, 2018). Estudos mostram a importância da vitamina E na patogênese da tuberculose pulmonar, atuando como micronutriente, melhorando a qualidade da saúde e na imunomodulação durante o curso da doença (CRUZADO *et al.*, 2019). Em homens adultos, concentrações séricas maiores de α -tocoferol foram relacionadas a menores índices de mortalidade em geral, assim como menores incidências de câncer e doenças cardiovasculares (CUSTÓDIO *et al.*, 2020).

2.4 IMPUREZAS ELEMENTARES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Os suplementos alimentares são do gênero alimentício e, conseqüentemente, é de exclusiva responsabilidade do produtor/distribuidor assegurar que a rotulagem representa fielmente o conteúdo do produto e que os ingredientes são seguros. Entretanto, nem sempre a segurança destes produtos é garantida uma vez que têm sido descritos incidentes com suplementos alimentares, incluindo casos associados a contaminações com metais pesados (MUSTATEA *et al.*, 2021).

As plantas medicinais e óleos de origem vegetal utilizados como matéria-prima na obtenção de suplementos alimentares podem ser frequentemente contaminadas com metais pesados devido ao ambiente em que são cultivadas, também sendo contaminadas com metais pesados na indústria ou na agricultura. Além da contaminação da matéria-prima, a contaminação dos suplementos também pode ser causada acidentalmente por contaminação

cruzada no fluxo tecnológico ou por transferência da embalagem utilizada no produto (AMARIEI, GHEORGHE, OROIAN., 2017; MUSTATEA *et al.*, 2021).

2.4.1 Toxicidade e contaminação do chumbo em suplementos alimentares

O Pb é um poluente ambiental nocivo que tem altos efeitos tóxicos para muitos órgãos do corpo. Embora possa ser absorvido pela pele, ele é absorvido principalmente pelos sistemas respiratório e digestivo, este elemento é absorvido no intestino e posteriormente transportado para os tecidos moles, por exemplo, no fígado e rins, onde se acumula ao longo do tempo. O principal processo de transporte, para diferentes tecidos corporais a partir do intestino, é através dos glóbulos vermelhos, onde ocorre a ligação com a hemoglobina. Quase 99% do Pb no sangue é observado nos eritrócitos, e com aproximadamente 1% no soro e no plasma. A distribuição nos órgãos (pulmões, baço, cérebro, aorta, córtex renal, ossos e dentes) depende muito da concentração deste no plasma, e não no sangue total. A meia-vida do Pb no sangue é estimada em 35 dias, enquanto a meia-vida no tecido mole é estimada em 40 dias e nos ossos por até 30 anos (KABATA-PENDIAS *et al.*, 2015; BALALI-MOOD *et al.*, 2021).

A contaminação de Pb em adultos pode causar alterações no sistema nervoso (causando fadiga, alterações de humor, sonolência, distúrbios de concentração, dores de cabeça, coma), no sistema circulatório (aumento da pressão arterial e, em casos graves, encefalopatia), no sistema gastrointestinal (cólicas/dores, náuseas, vômitos, diarreia e constipação) e hormônios (distúrbios de fertilidade, diminuição da libido), outros efeitos incluem adstringência da boca, gosto metálico, sede ou mesmo morte (WANI *et al.* 2015;.CHARKIEWICZ, 2020).

A exposição a este metal também tem sido associada ao câncer. Uma meta-análise avaliou a relação entre tumores cerebrais e exposição ocupacional em vários países (EUA, Finlândia, Suécia, Austrália e Rússia) (AHN *et al.*, 2020). Pesquisas subsequentes na Finlândia e no Reino Unido confirmaram uma relação entre as concentrações deste elemento no sangue e alguns tipos de câncer (cérebro e pulmão) (STEENLAND *et al.*, 2019).

A toxicidade do Pb tem sido um assunto de interesse devido ao seu efeito tóxico em plantas, animais e humanos. Um aumento em várias atividades industriais e o uso de produtos, como agroquímicos, óleos, tintas, minerações, podem levar a contaminação no meio ambiente e, portanto, este metal pode entrar na cadeia alimentar. Sendo um dos metais pesados mais tóxicos, a ingestão de Pb através da cadeia alimentar provou ser um potencial perigo para a saúde humana (KUMAR *et al.*, 2020; GAO 2020; BALALI-MOOD *et al.*, 2021).

Na literatura são encontrados estudos que investigaram a presença de Pb em suplementos, como o estudo de Pinheiro e colaboradores (2019) que investigaram a presença deste elemento e de outros metais (arsênio, cádmio e mercúrio) em suplementos para atletas, as amostras na forma sólida e líquida foram digeridas com auxílio de micro-ondas usando uma solução diluída de ácido nítrico. O teor dos metais foi determinado em 10 suplementos através da análise por Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*). Os resultados obtidos foram de 0,032 a 0,042 $\mu\text{g/g}$ de Pb e 0,008 a 0,030 $\mu\text{g/g}$ de Cd, nenhuma das amostras analisadas continham os elementos acima do permitido pela USP.

Beltrán e colaboradores (2020) determinaram Pb e outros metais pesados em suplementos alimentares, as amostras em pó foram analisadas por Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X de Reflexão Total (TXRF). De acordo com os autores, a concentração de Pb nas duas amostras analisadas foi de 1,12 e 1,32 $\mu\text{g/g}$, as amostras apresentaram concentrações de metais dentro dos limites máximos permitidos pelas normas internacionais.

Um estudo de Leal e colaboradores (2020) determinou Pb em suplementos alimentares comercializados no Brasil usando amostragem direta de sólidos e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. A concentração de Pb foi determinada em 74 amostras e o conteúdo variou na faixa de 0,04 a 25,3 $\mu\text{g}/\text{dia}$, sendo que 2 amostras tiveram resultados acima do permitido pela USP (LEAL *et al.*, 2020).

Yao e colaboradores (2023) quantificaram alguns metais nocivos à saúde, entre eles o Pb e o Cd, em suplementos de cálcio comercializados na China. A quantificação dos metais nas amostras sólidas foi realizada por ICP-MS e os resultados encontrados nos suplementos foram de até 8,49 mg/kg para Pb e 1,104 mg/kg para Cd. Os resultados estão dentro dos limites estabelecidos pelos padrões nacionais chineses e pelo JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*).

2.4.2 Toxicidade e contaminação do cádmio em suplementos alimentares

O Cd é um metal pesado que não tem função fisiológica e é tóxico para os humanos, este elemento se espalha no meio ambiente na forma de óxido de cádmio, cloreto de cádmio ou sulfeto de cádmio por meio de atividades industriais que utilizam como reagente corrosivo, estabilizador em produtos de PVC, pigmentos coloridos e baterias de Ni-Cd (FRIBERG *et al.*, 2019; GENCHI *et al.*, 2020); HAO *et al.*, 2017; GENCHI *et al.*, 2020).

Quando o Cd entra no corpo, ele é transportado para a corrente sanguínea via eritrócitos e albumina e é então acumulado nos rins, fígado e intestino, a sua excreção de cádmio do corpo é lenta e ocorre através dos rins, urina, saliva e leite durante a lactação (TINKOV *et al.*, 2018 a; SATARUG, 2018).

Em humanos, a exposição a este metal pode resultar em uma variedade de efeitos adversos, como disfunção renal e hepática, edema pulmonar, dano testicular, osteomalácia e dano ao sistema hemopoiético e às glândulas supra-renais. Além disso, devido aos seus efeitos citotóxicos que podem levar a eventos apoptóticos ou necróticos é considerado um elemento carcinogênico do Grupo 1 da classificação da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) (TINKOV *et al.*, 2018 b). A exposição ocupacional ou ambiental a este elemento tem sido relacionada a cânceres de pulmão, mama, próstata, pâncreas, bexiga e nasofaringe (MEZYNSKA, BRZÓSKA, 2018).

Na literatura algumas pesquisas investigaram a presença de Cd em suplementos, como no estudo de Corazza e Tarley (2016) que determinaram Cd em suplementos de ômega 3 empregando extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) e espectrometria de absorção atômica em forno de chama termo pulverizada (TS-FF-AAS). Os valores de Cd encontrado nas amostras variaram entre 37,3 a 54,5 ng/g.

Begu e colaboradores (2019) também determinaram Cd em suplementos multivitamínicos/minerais através de um procedimento com três etapas de coprecipitação para a separação dos metais e posterior determinação por ICP-MS. Os níveis médios de Cd ficaram entre 28 e 125 ng/g, indicando que a quantidade de Cd ingerida por porção estava abaixo dos limites de exposição diário seguros.

Neher e colaboradores (2018) determinaram 15 metais, entre eles o Cd, em 11 amostras de suplementos alimentares contendo espirulina. Neste estudo, foi realizada uma digestão assistida por ultrassom para a determinação multielementar por espectrometria de emissão atômica induzido por micro-ondas. As concentrações de Cd variaram de 1,74 a 2,14 µg/g, que conforme os autores estavam acima dos níveis permitidos pelo FDA e pode ser explicado pela capacidade das algas de bioacumular este elemento (NEHER *et al.*, 2018).

Jairoun e colaboradores (2020) determinaram metais pesados em suplementos alimentares comercializados nos Emirados Árabes Unidos, foram analisados 277 produtos por ICP-MS. Nenhum dos metais analisados apresentaram limites acima do permitido pela *American Herbal Products Association* (AHPA), a ingestão diária média de chumbo foi de 0,85 µg em comparação com a ingestão diária aceitável (IDA) de 20 µg, e a ingestão diária média de cádmio foi de 0,73 µg em comparação com a ingestão diária aceitável de 6 µg.

Ćwieląg-Drabek e colaboradores (2020) investigaram o risco do consumo de suplementos alimentares a base de plantas determinando cádmio e chumbo por Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) em 41 suplementos alimentares. As concentrações de cádmio em todas as amostras estavam abaixo do estabelecido pela legislação de 1,0 mg/kg.

Mustatea e colaboradores (2021) determinaram Pb e Cd em suplementos alimentares comercializados na Romênia. Para determinar os metais por GFAAS as amostras foram digeridas em micro-ondas com HNO₃ e H₂O₂. As concentrações de Pb variaram de 0,002 a 1,274 mg/kg e a faixa de concentração de Cd foi de 0,0002-0,203 mg/kg, tais resultados não excederam os limites estabelecidos pela *Commission Regulation (EC) 1881/2006* (3,0 mg/Kg Pb e 1,0 mg/Kg Cd). Além disso eles constataram que os suplementos alimentares obtidos de plantas tiveram valores superiores quando comparados com os suplementos alimentares de origem mineral ou animal.

2.5 CONTAMINAÇÃO DE CHUMBO E CADMIO EM ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS

A maioria dos estudos que investigaram metais em suplementos foram realizados em produtos na forma farmacêutica de pó e comprimidos. Existem poucos estudos com cápsulas oleosas, mas há na literatura muitos estudos que investigaram metais em óleos comestíveis que muitas vezes são matérias primas de suplementos oleosos.

As várias etapas da produção de óleo comestível, como a embalagem, o transporte ou o armazenamento, podem causar contaminação inorgânica nos óleos. Durante o processamento e armazenamento de óleos vegetais, os equipamentos e tubulações contêm vestígios de elementos metálicos que podem causar este tipo de contaminação (XIA *et al.*, 2021). Durante o cultivo dos grãos, o uso de fertilizantes e pesticidas contendo metais pesados como chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio também podem fazer com que os óleos sejam contaminados (SHAH, SOYLAK, 2022).

Taghizadeh e colaboradores (2022) determinaram Pb e Cd em óleo de gergelim e óleo de girassol para avaliar o risco de exposição dos humanos, foram analisadas 375 amostras de óleos vegetais por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*). Em todas as amostras analisadas os níveis de Pb e Cd não refletiram nenhum risco, os resultados ficaram abaixo do limite de quantificação dos métodos aplicados (1,0 µg/kg).

Mukhametov e colaboradores (2020) determinaram metais pesados em óleos vegetais produzidos no Cazaquistão. A análise de amostras dos óleos vegetais revelou que a maior contaminação por chumbo foi de 0,065 mg/Kg em óleo de linhaça. A maior quantidade de cádmio foi encontrada no óleo de cártamo no teor de 0,009 mg/Kg. O conteúdo de metais pesados nas amostras analisadas no estudo atendeu aos requisitos da Comissão do Codex Alimentarius.

Rounizi e colaboradores (2020) determinaram metais pesados em óleo de gergelim por ICP-OES, o estudo mostrou que a semente de gergelim analisada continha 3,27 mg/kg de Pb e 0,058 mg/kg de Cd, e que quando a semente passava pelo processo de extração do óleo esses valores diminuíram consideravelmente (0,37 mg/kg Pb e 0,021 mg/kg Cd). No entanto no mesmo o óleo extraído o valor de chumbo é superior ao permitido pelo *Codex Alimentarius* de 0,1 ppm em óleos comestíveis.

Um estudo de Magalhães e colaboradores (2021) determinou metais em diversos óleos vegetais, dentre eles óleo de cártamo, óleo de coco, óleo de linhaça e óleo de chia, os metais foram quantificados por ICP-MS. Os elementos Cd e Pb foram encontrados variando de 19,5 a 20,2 µg/Kg e 20,6 a 22,2 µg/Kg, respectivamente. Neste contexto, todos os diferentes óleos comestíveis analisados atenderam os padrões de qualidade recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.6 MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS OLEOSAS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS

Vários métodos de preparo amostra podem ser utilizados para determinar metais em amostras oleosas. A escolha do método de preparação deve considerar fatores, como técnica analítica instrumental que será utilizada, o número de amostras a serem analisadas com precisão e exatidão requeridas, disponibilidade de equipamentos e tempo de preparação (SÁNCHEZ *et al.*, 2015). A seguir serão discutidos os principais métodos de preparo de amostra reportados na literatura para determinação de metais em amostras oleosas.

2.6.1 Digestão ácida ou mineralização

Métodos baseados em digestão ácida ou mineralização consistem na dissolução da amostra com ácidos inorgânicos, que pode ser realizado geralmente em chapas ou blocos de aquecimento, em frascos aberto ou fechado. A decomposição ácida permite minimizar, ou até mesmo eliminar, problemas relacionados com matrizes complexas, pois consiste na destruição

da matéria orgânica existente nas amostras em presença de um ácido mineral oxidante, mistura de ácidos oxidantes ou ainda mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio, sob aquecimento. Os ácidos mais utilizados são HNO_3 , H_2SO_4 , HCl , e HClO , os quais podem oxidar completamente a maioria das amostras se o aquecimento for feito em temperaturas adequadas durante o tempo necessário, possibilitando que os analitos estejam na solução ácida resultante na forma inorgânica mais simples e apropriada para a análise (KRUG, 2008).

Este procedimento tem como grande vantagem a utilização de padrões inorgânicos aquosos na calibração, pois as características físicas das soluções resultantes são similares às soluções de referência (GAB-ALLAH *et al.*, 2019; NANDASIRI *et al.*, 2023). Poucos trabalhos têm dedicado a utilização de procedimentos que empregam a digestão ácida com aquecimento em chapa ou bloco digestor no pré-tratamento de amostras de óleos vegetais. Entretanto, a decomposição ácida assistida por micro-ondas como uma alternativa efetiva aos procedimentos convencionais de decomposição tem sido bastante empregada (MOHAMED, ZAINUDIN, YAAKOB, 2020; BALDO *et al.*, 2020), devido a vantagens como redução nos tempos de digestão e dos problemas associados a perdas do analito e contaminação da amostra, além de ser possível utilizar ácidos diluídos ou em quantidades reduzidas.

Keshvari e colaboradores (2021) determinaram Pb, Cd, As e Hg em suplementos alimentares consumidos no mercado Iraniano. Foram analisados 45 produtos de marcas diferentes, cada amostra foi digerida com ácido nítrico pelo método de digestão úmida e posteriormente analisadas por FAAS. Os teores de chumbo, cádmio, arsênio e mercúrio nas amostras investigadas não apresentaram níveis significativos que possam estar associados à toxicidade. Todos os quatro metais estavam presentes em concentrações abaixo dos limites recomendados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e AHPA (*American Herbal Products Association*).

A maioria dos estudos que envolvem digestão ácida com amostras oleosas referem-se a amostras de óleos comestíveis ou óleos crus.

Mohajer e colaboradores (2019) descreveram a determinação de As, Pb, Cr, Cd, Cu, Mn e Zn por ICP-OES em amostras de óleo de farelo de arroz digeridas por micro-ondas empregando a mistura de HNO_3 e H_2O_2 .

Karasakal (2020) determinou os teores de vários elementos traços em óleos comestíveis por ICP-OES, para o preparo das 125 amostras de óleos (óleo de soja e óleo de nozes) o autor utilizou HNO_3 e H_2O_2 para a digestão por micro-ondas.

Taghizadeh e colaboradores (2020) investigaram os níveis de alguns elementos (As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Fe e Cu) em cinco diferentes tipos de óleos (canola, milho, oliva, gergelim e

girassol) adquiridos no mercado Iraniano. As amostras foram digeridas em HNO₃ e H₂O₂ em sistema de digestão por micro-ondas e posteriormente os elementos foram determinados usando ICP-OES.

A digestão ácida requer um tempo relativamente longo de análise e necessita de um controle cuidadoso da temperatura para evitar a perda de metais voláteis (DAMAK *et al.*, 2019). Outras desvantagens deste método é maior risco de contaminação (quando realizado em sistema aberto ou devido as impurezas dos reagentes), tempo elevado de execução, elevado consumo de reagentes, possibilidade de perda do analito pela formação de precipitados insolúveis no tratamento com alguns tipos de ácidos e efeitos de matriz devido à não decomposição total da matéria orgânica (POSCIC *et al.*, 2019; GAB-ALLAH *et al.*, 2019).

2.6.2 Diluição com solvente orgânico

A diluição com solvente orgânico é um método de preparação bastante simples e rápido, que consiste simplesmente na diluição da amostra com o solvente apropriado. Alguns exemplos de solventes utilizados são xileno, isobutilmetacetona, dimetilbenzeno, 1,2 dimetilbenzeno, 4-metil-2-pentanona, querosene, pentano, hexano, heptano entre outros (GAB-ALLAH *et al.*, 2019; MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

Apesar da simplicidade, muitos inconvenientes estão relacionados com a aplicação deste método de preparo: i) a maioria dos solventes utilizados são tóxicos e carcinogênicos; ii) necessidade do uso de padrões orgânicos, que apresentam maior custo que os padrões inorgânicos; iii) baixa estabilidade do analito dos padrões orgânicos diluídos para calibração; iv) alteração da concentração do analito devido a adsorção nas paredes do recipiente ou ainda pela evaporação do solvente; v) a gestão de alguns solventes orgânicos com equipamentos convencionais de laboratório é difícil devido à sua elevada pressão de vapor e/ou baixa viscosidade e vi) a diluição em solventes orgânicos implica na diluição do próprio analito exigindo técnicas com elevada sensibilidade (MARTÍNEZ *et al.*, 2020; KORN *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2012).

Panggabean e colaboradores (2019) determinaram Cd em óleo lubrificante por FAAS a partir da diluição direta com solventes orgânicos. No estudo, os melhores resultados foram obtidos com a diluição direta com metilisobutilcetona.

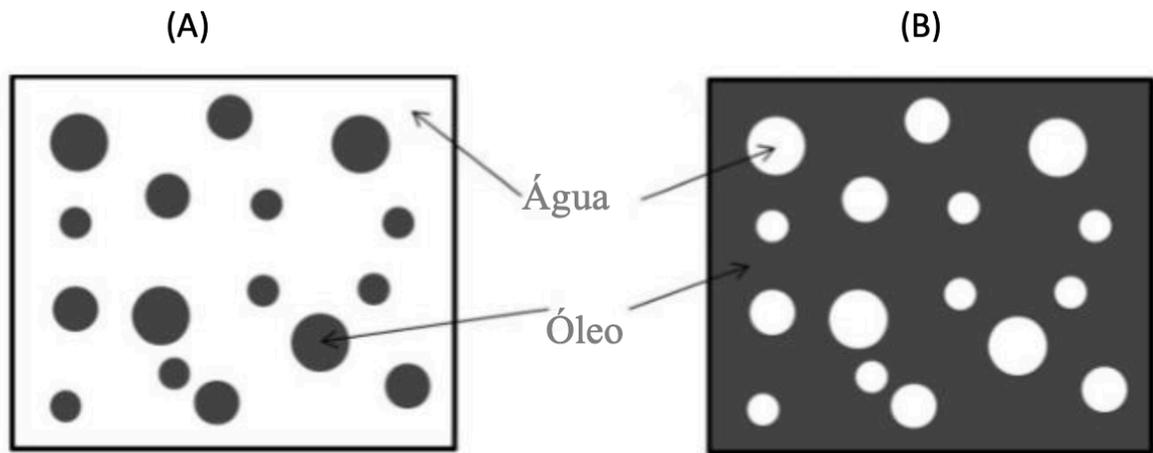
Li e colaboradores (2020) propuseram a determinação de Ni em amostras de óleo cru. As amostras foram preparadas por meio de diluição simples com ciclohexano e posterior análise por espectrômetro de absorção eletrotérmica baseado em bobina de tungstênio portátil.

Martínez e colaboradores (2020) determinaram Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Ti e V em óleos vegetais por ICP-OES. As amostras foram diluídas com xileno e introduzidas no equipamento através de um sistema integrado de introdução de amostras com tocha de alta temperatura (hTISIS). A análise mostrou-se rápida e precisa para determinar multielementos em óleos vegetais.

2.6.3 Emulsão

Como uma alternativa às soluções em solventes orgânicos e suas misturas, o uso de emulsões tem sido proposto como método de preparo de amostras oleosas. A emulsão é um sistema de duas fases em que uma fase é dispersa na outra na forma de gotículas, estabilizados por um emulsionante. A fase presente na forma de gotas é referida como fase interna ou fase dispersa e a fase que forma a matriz na qual as gotas estão suspensas é chamada de fase contínua ou fase externa. Os dois principais tipos de emulsões são óleo em água (O/A) onde o óleo é disperso como gotículas em uma fase aquosa e água em óleo (A/O) que as partículas de água estão dispersas como gotículas no óleo, como pode ser observado na Figura 2. A emulsão O/A é a mais comumente usada e o tipo de emulsão pode ser determinado pela quantidade relativa de cada fase (VIANA *et al.*, 2014).

Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de emulsão: a) (O/A), onde gotículas de óleo estão dispersas em água (fase contínua) e b) (A/O), onde gotículas de água estão dispersas em óleo (fase contínua).



Fonte: adaptado de VALASQUES *et al.* (2017).

As emulsões são termodinamicamente instáveis, não se formam espontaneamente, o que torna necessário agitação manual ou mecânica, além disso tende à separação de fases dos seus componentes imiscíveis ao longo do tempo. Para aumentar a estabilidade da emulsão é preciso adicionar um surfactante ou tensoativo, pois este forma barreiras físicas que protegem a gota de coalescência, além de reduzir a tensão superficial entre a água e o óleo (VALASQUES *et al.*, 2017).

Os surfactantes correspondem a grupos de substâncias cujas moléculas são anfifílicas, ou seja, sua estrutura possui uma parte hidrofílica (solúvel em água) e outra parte lipofílica (solúvel em lipídeos) e, de acordo com sua estrutura, podem ser classificados em não iônicos (Triton X-100, Triton X-114, Tween 80 , Tween 60), catiônicos (brometo de cetiltrimetil amônio, cloreto de cetilpiridínio), aniônicos (dodecil sulfato de sódio, dodecil benzeno sulfonato de sódio) ou anfóteros (N-alkil e C-alkil betaína e sultaína, álcool amino fosfatidil) (PELIZZETTE, PRAMAURO, 1985).

A emulsificação de amostras constitui uma atraente alternativa aos métodos convencionais empregados na modificação de matrizes complexas, devido a uma série de vantagens como: i) não requer a destruição da matéria orgânica; ii) não ocorrem perdas do analito por volatilização; iii) requer baixo ou nenhum consumo de ácidos; iv) possibilita o uso de padrões aquosos. Além disso, em comparação com a digestão ácida da matéria orgânica, a emulsificação da amostra introduz muito menos contaminantes externos à amostra, uma vez que o manuseio da amostra e a adição de reagente são minimizados (VIANA *et al.*, 2014; SHAH, SOYLAK, 2022).

Desde as primeiras pesquisas na década de 1940, as emulsões já receberam inúmeras aplicações, tais como: indústria de cosméticos, para aumentar a qualidade dos produtos; indústrias de produtos farmacêuticos para tornar o sabor do medicamento mais atraente ou com propriedades antibacterianas; indústria de petróleo, baseada na baixa tensão interfacial e boa propriedade emoliente das emulsões; extração de metais nobres de minérios com baixo conteúdo de metais; pesquisas de poluentes ambientais em amostras de solo e efluentes dissolvidos em emulsões (BURGUERA, BURGUERA, 2012; SHAH, SOYLAK, 2022).

Castillo e colaboradores (1999) desenvolveram um método para a determinação de vários metais (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Tl, Pb, U, V e Zn) em azeites por ICP-MS. Para o preparo das amostras foi realizada a formação de emulsão com 20% HNO₃ e 1,5 mL de Triton X-100. Outro estudo que utilizou emulsões no preparo de amostras para análise de metais foi o estudo de Huang e colaboradores (2001). Neste estudo, foi investigada a determinação de Zn, Cd e Pb em óleo vegetal por vaporização eletrotérmica em combinação com espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ETV-ICP-MS). Para a quantificação as amostras foram preparadas na forma de emulsão contendo 10 % (v/v) de óleo, 2 % (v/v) Triton X-100, 2 % (v/v) H₂O₂ e 0,4 % (v/v) HNO₃.

2.6.3.1 Extração induzida por quebra de emulsão (EIEB)

A extração induzida por quebra de emulsão (EIEB) com aplicação na separação e/ou pré-concentração de metais foi proposto por Cassella e colaboradores, em 2010, em um estudo que tinha como objetivo determinar metais traços em amostra de diesel por ETAAS (do inglês, *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*). A técnica é baseada na extração líquido-líquido na qual a amostra orgânica é emulsificada com uma solução extratora contendo ácido e um agente emulsificante após vigorosa agitação. O ácido auxilia na extração do analito presente na fase orgânica para a fase aquosa e o agente emulsificante é adicionado para diminuir a tensão interfacial entre as fases, aumentando a interação da amostra com a solução ácida. Durante o processo de quebra da emulsão, o qual pode ser induzido por aquecimento ou centrifugação, os analitos são transferidos do óleo para a fase aquosa ácida que é separada e utilizada para a determinação dos metais extraídos (CASSELLA *et al.*, 2010).

A EIEB é uma alternativa para tratamento de amostras que possuem alta carga de substâncias orgânicas em relação aos métodos de preparação de amostras convencionais, porque promove a extração e/ou pré-concentração dos analitos de interesse para uma fase aquosa. A técnica vem sendo explorada para a determinação de metais em diversas matrizes

com alto teor orgânico, tais como: petróleo (TREVELIN *et al.*, 2016), gasolina (SOUZA *et al.*, 2021), biodiesel (PEREIRA, CASSELLA, 2022) e óleos comestíveis (CERQUEIRA *et al.*, 2022). O Triton X-114 e o Triton X-100 são surfactantes aniônicos comumente usados na EIBB, geralmente acidificados com HNO₃. As soluções ácidas destes tensoativos são adicionadas nas amostras e agitadas manualmente, por agitadores automáticos ou ainda submetidos a banhos de ultrassom, para a formação das emulsões (SOUZA *et al.*, 2021).

Além de evitar etapas morosas, como no método de digestão ácida de amostras, a EIEB apresenta outra importante vantagem quando aplicada às amostras com alto teor orgânico que é a transferência dos analitos de uma fase complexa para uma fase aquosa mais simples de ser analisada, possibilitando o uso de padrões aquosos que são mais acessíveis (VALASQUES *et al.*, 2017). Entretanto, alguns parâmetros devem ser otimizados para que a EIEB tenha maior eficiência dentre estes estão: a concentração e natureza do ácido, concentração do tensoativo, tempo de quebra, processo de quebra, entre outros (PEREIRA, CASSELLA, 2022).

2.7 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Várias técnicas analíticas instrumentais têm sido empregadas na determinação de metais em diferentes matrizes. Alguns estudos utilizam a espectrometria de absorção atômica para a determinação de metais em diferentes tipos de suplementos alimentares, como suplementos multivitamínicos (ADOLFO *et al.*, 2019), suplementos proteicos (ELGAMMAL, KHORSHE, 2019) e suplementos a base de plantas (GÓMEZ-NIETO *et al.*, 2017), no entanto poucos estudos determinaram metais em suplementos oleosos devido à complexidade da matriz.

A espectrometria de absorção atômica é considerada uma técnica analítica bem-sucedida e das mais utilizadas na determinação de elementos inorgânicos em baixas concentrações presentes numa ampla variedade de amostras, sejam estas líquidas, sólidas, em suspensão, e até mesmo gasosas. Esta técnica permite associação à sistemas de análise de amostras em fluxo e também estudos de especiação dos elementos presentes (CHILOV, 1975; WELZ *et al.*, 1993).

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, do inglês *Line Source Atomic Absorption Spectrometry*). 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 *et al.*, 2005; 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 busca por melhorias na razão sinal/ruído e a existência de limitações para a determinação de alguns elementos, fizeram com que um novo conceito surgisse, a espectrometria de absorção atômica com fonte contínua. Esta técnica utiliza o conceito da AAS, porém emprega uma única lâmpada de xenônio emitindo radiação de alta intensidade nas regiões do ultravioleta e do visível, um monocromador *double-echelle* de alta resolução e um detector de carga acoplada bidimensional. A alta intensidade da fonte melhora a razão sinal/ruído, além desta vantagem, esta técnica analítica possibilita usar linhas secundárias que normalmente são pouco intensas quando se utiliza lâmpadas monoelementares e também permite determinar elementos para os quais não existem lâmpadas monoelementares. O detector permite visualizar o espectro nas vizinhanças da linha analítica de interesse, permitindo identificar interferências espectrais e, também proporcionando a correção do fundo de forma simultânea à determinação elementar.

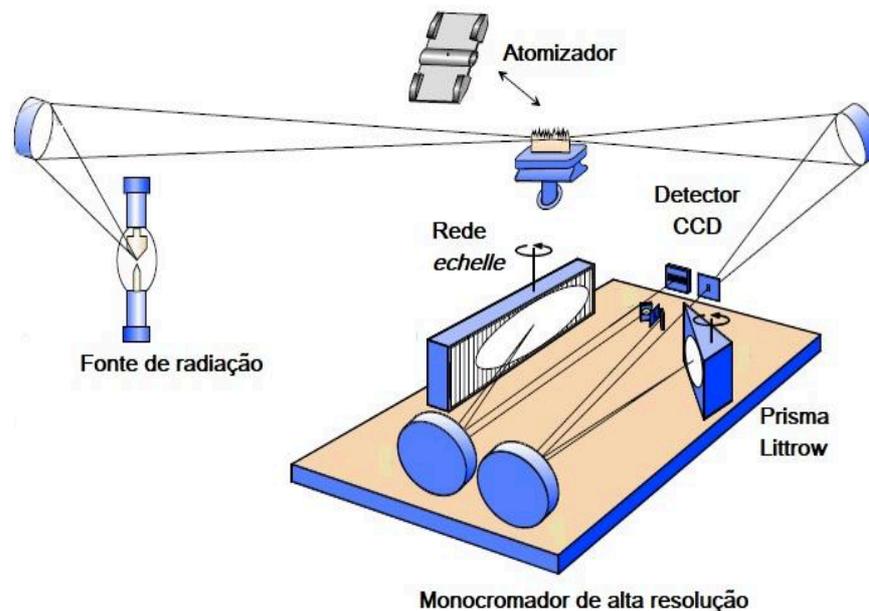
2.7.1 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua acoplado ao forno de grafite

A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR CS AAS) surgiu na década de 1990 para superar as dificuldades e limitações encontradas na técnica convencional de AAS. Inicialmente, foi comercializado o espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua somente com atomização em chama e após quatro anos foi equipado também com atomização em forno de grafite.

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, a partir da qual é emitida uma radiação de alta intensidade e na faixa da região

do UV-visível. Esta radiação passa pelo atomizador e chega a um monocromador duplo de alta resolução, constituído por um prisma pré-dispersor e de uma rede de difração do tipo *Echelle*. O prisma separa o espectro da radiação incidente na região de interesse e a rede de difração é responsável pela alta resolução do intervalo seleccionado. Após ser seleccionada, a radiação atinge o detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês *charge-coupled device*) contendo 512 pixels fotossensíveis independentes. Destes 512 pixels, 200 são destinados para 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). Um esquema com os principais componentes de um espectrômetro de HR CS AAS é apresentado na Figura 3.

Figura 3- Representação esquemática dos principais componentes de um espectrômetro de HR CS AAS. Adaptado de Welz et al, 2005.



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

O equipamento é controlado por um software que realiza o processamento dos dados pós-leitura, além de corrigir automaticamente os eventos contínuos, que incluem qualquer absorção de fundo que seja contínua dentro da janela espectral. Isso significa que o sinal obtido já está corrigido e o nível de ruído é extremamente baixo, como consequência, melhores limites de detecção, limites quantificação e precisão são alcançados. No entanto, se ocorrer sobreposição direta ou parcial da absorção de concomitantes com a linha do analito, o software

oferece a correção de fundo com algoritmo de mínimos quadrados (LSBC, do inglês *Least squares background correction*), usando espectros de referência (WELZ *et al.*, 2014), ou seja, é uma alternativa em que o espectro sem analito ou da matriz da amostra é subtraído do espectro de determinada amostra, resultando no espectro somente do sinal atômico (BORGES *et al.*, 2005).

A técnica HR CS GFAAS é muito empregada para a determinação de baixas concentrações de metais em diversos tipos de matrizes, pois apresenta alta sensibilidade e seletividade necessitando de reduzido volume de amostra.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para o preparo das amostras foram utilizadas uma balança analítica com quatro casas de precisão (Schimatzu), bloco digestor de Kjeldahl para 40 tubos, banho-maria digital e uma centrífuga (C4-12, jOUUn, Thermo Scientific, EUA).

Todas as determinações de Cd e Pb foram realizadas em um espectrômetro de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (AnalytikJena®, Alemanha), equipado com amostrador líquido automático MPE 60. 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 217,0005 nm e 228,8018 nm, para o Pb e o Cd, respectivamente. A quantificação do sinal analítico foi realizada através da medida de absorvância proveniente da área do pico, considerando dois ou três pixels adjacentes. O atomizador utilizado foi o forno de grafite sem plataforma para análise líquida com orifício dosador (Analytik Jena, Jena, Alemanha). O gás argônio utilizado como gás de proteção e purga possui pureza 99,999%. O programa de aquecimento do atomizador utilizado na determinação dos analitos nas emulsões é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Programa de temperatura aplicado na análise das emulsões, nas linhas analíticas 217,0005 nm e 228,8018 nm, para o Pb e o Cd respectivamente.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C / s)	Gás
Secagem	90	3	oxigênio
	110	5	oxigênio
Pirólise	500	50	oxigênio
	600 (Pb)	300 (Pb)	argônio
600 (Cd)	300 (Cd)		
Atomização	1400 (Pb)	1400 (Pb)	-
	1200 (Cd)	1200 (Cd)	
Limpeza	2550	500	argônio

Fonte: Autora.

3.2 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. Toda vidraria utilizada foi imersa em solução de HNO₃ 1% (v/v) em água por pelo menos 48 horas e, antes do uso, foi lavada com água ultrapura abundantemente.

3.3 AMOSTRAGEM

As amostras (n=9) foram obtidas no Brasil, em lojas físicas e virtuais. As formulações adquiridas foram analisadas e classificadas de acordo com o país de procedência e composição declarada pelo fabricante (material vegetal, nutrientes, aminoácidos e outros aditivos). Para realizar a análise de cada amostra foi preparado *pool* do mesmo lote (n=10), retirando o óleo de cada capsula gelatinosa.

Por razões legais o nome das amostras, independentemente do resultado, não será divulgado, procedendo-se assim à codificação do nome das amostras (A1- A9). Na Tabela 3 encontram-se descritas as características das 9 amostras que foram analisadas durante este trabalho.

Tabela 3 - Características das amostras de suplementos alimentares oleosos em estudo.

Amostra	Forma Farmacêutica	País de origem	Ingredientes declarados	Posologia/Modo de usar
A1	Cápsula	Importado	Óleo de linhaça, óleo de gergelim, óleo de cártamo, óleo de borragem, óleo de girassol	3 cápsulas por dia
A2	Cápsula	Importado	Ácido linoleico do óleo de cártamo e vitamina E	5 cápsulas por dia
A3	Cápsula	Brasil	Óleo de cártamo	2 cápsulas por dia
A4	Cápsula	Brasil	Óleo de cártamo, vitamina B1, B3, D, E e biotina (vitamina H)	4 cápsulas por dia
A5	Cápsula	Brasil	Óleo de cártamo	4 cápsulas por dia
A6	Cápsula	Brasil	Óleo de peixe	3 cápsulas por dia
A7	Cápsula	Brasil	Óleo de cártamo e vitamina E	4 cápsulas por dia
A8	Cápsula	Brasil	Óleo de peixe	3 cápsulas por dia
A9	Cápsula	Brasil	Óleo de peixe	2 cápsulas por dia

Fonte: Autora.

3.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Água de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω /cm) foi obtida utilizando em sequência os equipamentos de deionização, destilação e sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

As soluções estoques aquosas individuais de Pb e Cd foram preparadas em 0,1% (v/v) de HNO₃ destilado, através da diluição apropriada de soluções padrões monoelementares contendo 1000 mg/L (Sepcosol, USA).

Para os procedimentos de preparo de amostra baseado na decomposição ácida em bloco digestor foram utilizadas HNO₃ 65 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Brasil), H₂SO₄ 95% (m/m) (Vetec, Brasil), H₂O₂ 30% (m/v) (Dinâmica, Brasil).

As soluções oleosas usadas nos testes de recuperação foram preparadas a partir da diluição de padrões organometálicos de Pb e Cd de 1000 mg/g (SPC Science, Québec, Canada). Os padrões oleosos foram diluídos em óleo base Conostan 75cSt (SPC Science, Québec, Canada).

A solução ácida de Triton X-100 usada para a emulsificação da amostra foi preparada pela dissolução de 1,25 g do Triton X-100 (Vetec, RJ, Brasil) em 25 mL de solução HCl 15% v/v. O Ácido clorídrico 38,5% m/m padrão analítico (Labsynth, São Paulo, Brasil) e tolueno (Química Moderna, São Paulo, Brasil) também foram utilizados no preparo das amostras.

3.5 PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO INDUZIDA POR QUEBRA DE EMULSÃO

Inicialmente, pesou-se 0,5 g de amostra dentro de um tubo de polipropileno de 15 mL (tipo falcon) e adicionou-se 1,5 mL de tolueno, agitou-se manualmente durante 20 segundos. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de solução ácida de Triton X-100 5% m/v (HCl 15% v/v), agitou-se por 30 segundos, assim foi obtida a emulsão que posteriormente foi rompida com centrifugação durante 5 minutos a 4000 rpm. Assim, obtiveram-se duas fases visivelmente separadas: uma orgânica, contendo a parte oleosa da amostra e solvente, e outra fase aquosa ácida, contendo os metais extraídos. Um volume de aproximadamente 2,0 mL da fase aquosa foi retirado com o auxílio de uma micropipeta para posterior análise por HR CS GFAAS. Os brancos das amostras foram preparados adicionando os reagentes aos tubos e, em seguida, submetidos ao mesmo procedimento descrito.

3.6 DIGESTÃO ÁCIDA PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO E CÁDMIO POR HR GF-AAS

Devido à indisponibilidade de material de referência certificado para óleos vegetais, as amostras também foram preparadas por meio da decomposição ácida em sistema aberto com aquecimento convencional (bloco digestor) como forma de obter um procedimento comparativo aos métodos propostos neste estudo. O procedimento consiste em pesar aproximadamente 1,0 g de amostra, adicionar 5,0 mL de HNO₃ e 3,0 mL de H₂SO₄, as misturas resultantes foram submetidas a aquecimento a 200 °C até completa carbonização. Uma adição de 6,0 mL H₂O₂ foi feita para a dissolução da massa carbonizada e a reação foi mantida sob aquecimento a 200 °C até a obtenção de soluções límpidas e incolores. A duração do procedimento é de 120 minutos. Os brancos de amostra foram preparados pela adição dos reagentes nos tubos de reação e então submetidos ao mesmo procedimento descrito. As soluções (amostras e brancos de amostra) resultantes dos procedimentos de digestão foram transferidos para frascos de polipropileno e os volumes completados para 10,0 mL com água deionizada.

3.7 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 exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), linearidade, faixa de concentração, limite de quantificação e limite de detecção. Além disso, diferentes curvas analíticas preparadas em diferentes dias (n=3) foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA).

3.7.1 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de recuperação do padrão orgânico na amostra, através da adição de três concentrações distintas do elemento em estudo antes do processo de extração das amostras. A recuperação (R) ou fator de recuperação foi expresso em porcentagem.

3.7.2 Precisão

A precisão dos métodos foi comprovada através da repetibilidade. O teste foi realizado com seis amostras independentes do mesmo lote, com a adição dos padrões de cada elemento estudado antes do processo de extração das amostras. 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).

3.7.3 Linearidade e faixa de concentração

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas com oito concentrações diferentes para as soluções preparadas em triplicata. Os resultados foram usados para obter uma reta por regressão usando o método dos mínimos quadrados. A comprovação da linearidade foi dada através do coeficiente de correlação (r). A faixa de concentração testada para os elementos em estudo foram de 0-20 µg/L para o Pb e Cd.

3.7.4 Limites de quantificação e detecção

Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram obtidos através do método do branco. Desta forma, o branco da extração 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. Embora a determinação dos limites de detecção e de quantificação não seja exigida para os métodos com finalidade de determinação de impurezas elementares (Categoria 1), no presente estudo optou-se por analisar esses parâmetros de validação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

A otimização pode ser definida como o ato de melhorar o desempenho de um sistema, processo ou produto, a fim de obter o máximo de benefício a partir deles. No campo da Química Analítica, a otimização está relacionada com o estabelecimento de condições experimentais em que um procedimento seja capaz de produzir a melhor resposta possível (CALDAS *et al.*, 2011).

Neste estudo, as condições experimentais iniciais para a medição de Cd e Pb empregando o HR GF AAS foram estabelecidas conforme o método proposto para cada elemento pelo programa do equipamento e são mostrados na Tabela 4. Além disso, como método de preparo de amostra inicial optou-se por adaptar o método de Wuyke e colaboradores (2017). Desta forma, no método de extração inicial utilizou-se 0,5 g de óleo com 0,5 g de tolueno, após agitação manual adicionou-se 2 mL da solução extratora (20% HNO₃+10% TX-100). Uma vez formada as emulsões, as mesmas foram aquecidas a 90 °C por 15 minutos e, logo após, foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm para separação das fases. Ao final, a fase aquosa foi coletada e analisada por HR CS GFAAS.

Tabela 4 - Programa de temperatura aplicado na análise das emulsões, nas linhas analíticas 217,0005 nm e 228,8018 nm, para o Pb e o Cd respectivamente.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C / s)	Gás
Secagem	90	3	argônio
	110	5	argônio
Pirólise	300	50	argônio
Pirólise	800 (Pb)	200 (Pb)	argônio
	600 (Cd)	300 (Cd)	
Atomização	1500 (Pb)	1500 (Pb)	-
	1200 (Cd)	1400 (Cd)	
Limpeza	2450	500	argônio

Fonte: Autora.

Para otimização do método EIEB, uma amostra livre de analitos (A1) foi fortificada com padrões orgânicos (0,03 µg/g de cada elemento em estudo). A estratégia de otimização utilizada foi a univariada, o qual é caracterizada pelo monitoramento da influência de um fator de cada vez sobre a resposta experimental. A absorvância normalizada foi tomada como resposta analítica em todos os experimentos. Todas as medições foram realizadas em triplicata e seus respectivos desvios padrão foram considerados na análise dos resultados, além disso o melhor resultado foi observado através de teste estatístico (Student t-test) considerando $p < 0,05$.

Na escolha da composição da emulsão, prioritariamente considerou-se a necessidade de um solvente para diminuir a viscosidade da amostra. Posteriormente, foram investigadas as condições ideais para a quebra da emulsão. Para isto, todas as variáveis (tipo de ácido extrator, concentração de ácido, volume de solvente, concentração de surfactante e tempo de centrifugação) foram otimizadas.

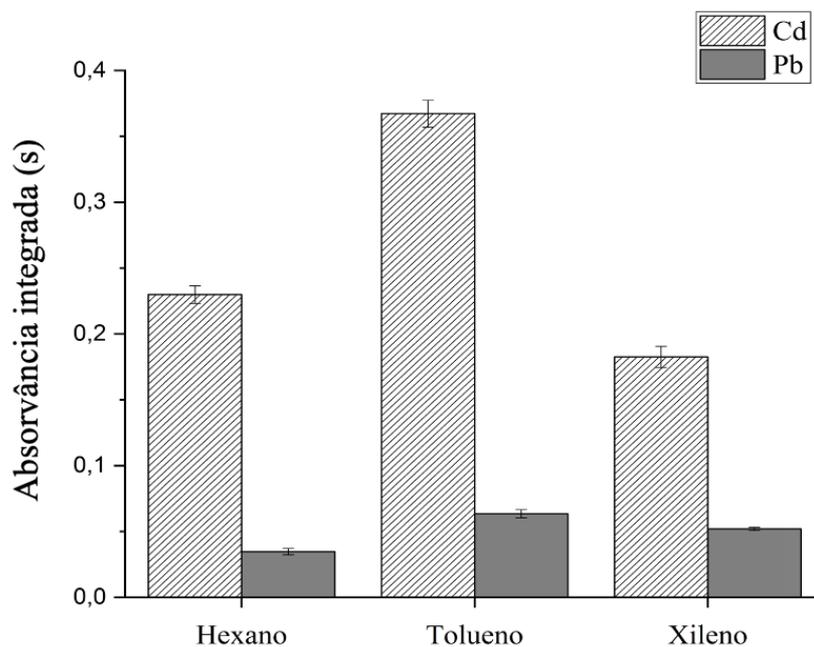
4.1.1 Avaliação da influência do tipo de solvente empregado para diluir as amostras

O primeiro parâmetro avaliado na otimização da metodologia proposta foi a influência do tipo de solvente na diluição e viscosidade das amostras. Um dos principais problemas observados na manipulação de amostras oleosas é a alta viscosidade, característica que dificulta o preparo das emulsões. As amostras de óleo foram diluídas com três diferentes solventes orgânicos (tolueno, xileno e hexano) na proporção 1:3 (amostra: solvente). Como pode ser

observado na Figura 4, as maiores absorvâncias foram obtidas com o tolueno para ambos os elementos em estudo. Além disso, o uso do tolueno resultou na separação de uma fase aquosa com menor turbidez, podendo indicar que a transferência de matéria orgânica para esta fase foi minimizada com este solvente.

Outros estudos também utilizaram o tolueno como solvente orgânico para a diluição de diferentes amostras. Caldas e colaboradores (2013) determinaram Cu, Fe e Mn em óleos lubrificantes por F AAS utilizando a EIEB como metodologia de preparo de amostra. As amostras de óleos lubrificantes foram diluídas com tolueno e a solução resultante foi emulsificada com uma solução de Triton X-114 em ácido nítrico. De forma semelhante, He e colaboradores (2015) empregaram a EIEB para a determinação simultânea de Mg, Cr, Ni, Cu e Pb em óleos lubrificantes usados por ICP-MS utilizando rutênio como padrão interno. A amostra de óleo foi diluída com tolueno e foi emulsionada com 1 mL de uma solução ácida de Triton X-114.

Figura 4 - Efeito do solvente empregado na diminuição da viscosidade do óleo utilizado na extração de Cd e Pb. As barras de erro representam o desvio padrão de três medidas.



Fonte: Autora.

O efeito da proporção do solvente foi avaliado apenas para o tolueno, os volumes foram variados de 0,5 a 2 mL de solvente. O sinal analítico aumentou com o aumento da quantidade

de solvente, sendo mais significativo para a determinação de chumbo. No entanto, em volumes maiores que 1,5 mL de solvente observou-se quantidades residuais de óleo emulsificado na interface entre a fase aquosa e orgânica, dificultando a coleta da fase aquosa. Assim, foi escolhido para o método o volume de 1,5 mL de tolueno para diluir as amostras.

4.1.2 Avaliação da influência da natureza e concentração do ácido empregado na extração dos metais

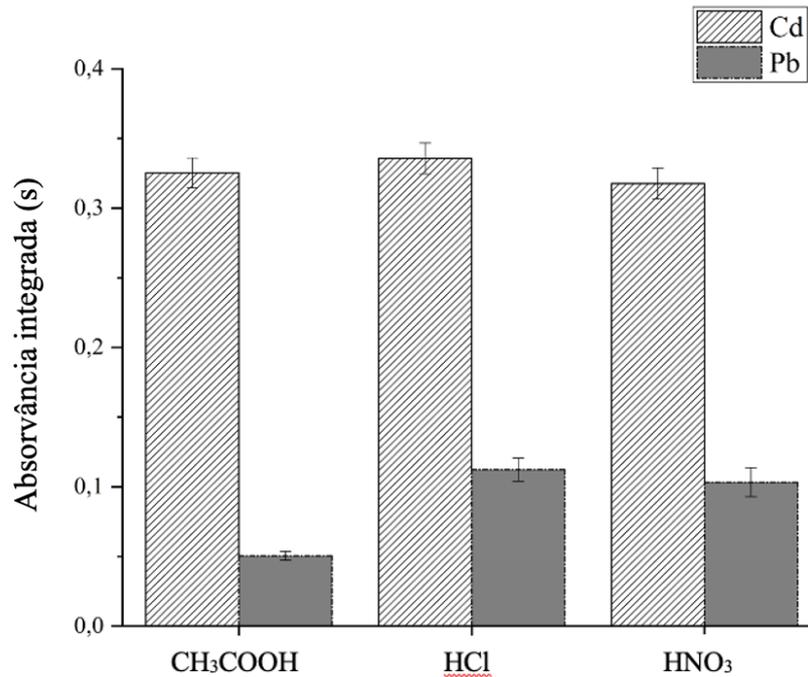
O ácido usado para formar a emulsão deve desempenhar um importante papel dentro da metodologia proposta, uma vez que o ácido é o responsável pela extração para a fase aquosa dos analitos a partir do óleo, onde estão presentes como moléculas organometálicas ou complexos orgânicos. Neste estudo, a concentração de Triton X-100 foi mantida em 10% m/v. Foram avaliados a adequação do ácido clorídrico, nítrico e acético, todos na concentração de 20% (m/v) frente a matriz oleosa.

A Figura 5 apresenta o comportamento dos analitos em cada um dos três ácidos. Para o chumbo, os ácidos nítrico e clorídrico forneceram respostas similares e superiores que o acético. O teste estatístico, a um nível de confiança de 95 %, não indicou diferença significativa ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$; $p > 0,05$) entre as amostras onde o Pb foi extraído com HCl na solução extratora e as amostras com HNO₃ ($t_{\text{calculado}} = 1,7522$; $t_{\text{crítico}} = 4,3026$; $p = 0,2218$).

Na extração do cádmio, o ácido clorídrico forneceu o maior sinal havendo diferença significativa ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$; $p < 0,05$) entre os ácidos clorídrico e acético ($t_{\text{calculado}} = 49,4323$; $t_{\text{crítico}} = 4,3026$; $p = 0,00002$). Assim, com o objetivo de obter um método de extração para ambos analitos, optou-se pelo ácido clorídrico que obteve bons resultados tanto para o chumbo quanto para o cádmio.

Encontram-se na literatura alguns estudos que avaliam diferentes ácidos extratores em metodologias que visam quantificação de metais em óleos vegetais. Trindade e colaboradores (2015) objetivaram desenvolver um método para determinação de Cu, Fe, Ni e Zn em óleos vegetais, após extração destes elementos por sonicação, sendo que as maiores recuperações foram alcançadas com o uso ácido clorídrico.

Figura 5 - Comparação das absorvâncias após EIEB utilizando HNO₃, HCl e HOAc como ácidos extratores em amostra enriquecida de suplementos oleosos. As barras de erro representam o desvio padrão de três medidas.

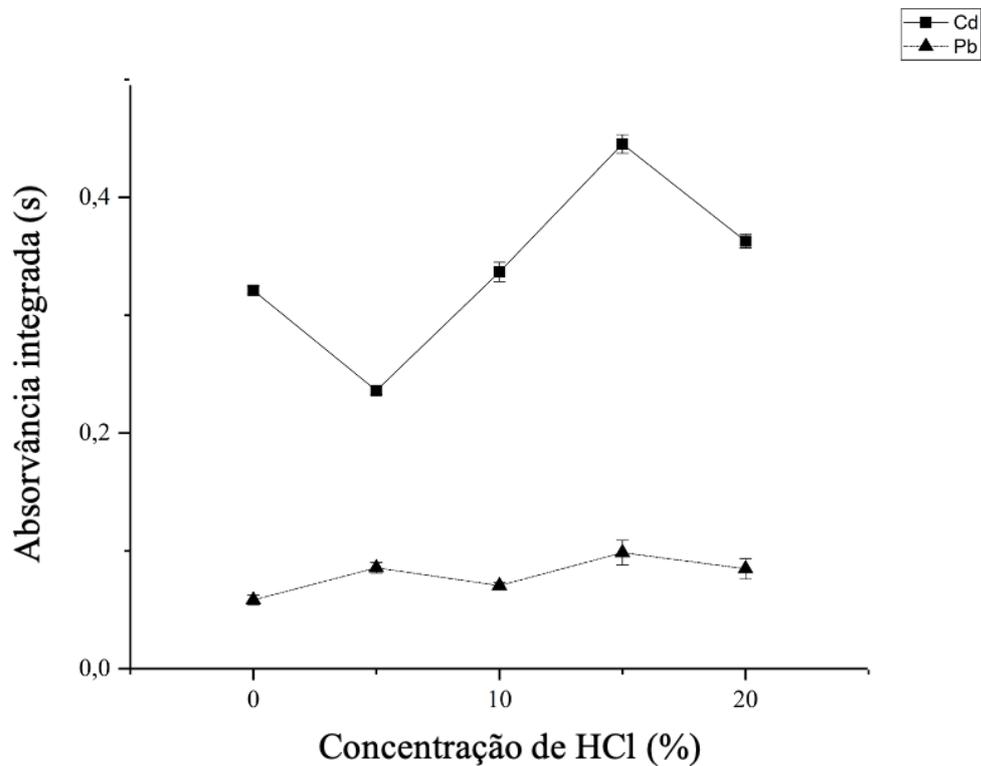


Fonte: Autora.

O uso do meio ácido na EIBB não tem como objetivo a dissolução completa da amostra como normalmente ocorre nos métodos clássicos de decomposição de amostra, contudo é necessário que o meio favoreça a migração dos metais presentes na fase orgânica para a fase aquosa.

Após definir que o ácido clorídrico foi o mais adequado para as extrações, foi investigada qual seria a sua melhor concentração. Assim, a concentração foi variada entre 5 e 20% v/v e os resultados estão apresentados na Figura 6. As quantidades mensuradas de Pb não variaram significativamente entre as concentrações de 5 - 20%. Entretanto, a extração máxima de Cd só foi alcançada com 15% v/v de HCl. Este achado pode indicar que o Cd está ligado através de interações mais fortes às moléculas orgânicas presentes no óleo em relação ao Pb. Desta forma, afim de garantir a extração total de ambos analitos, a solução utilizada para a emulsificação foi preparada com uma concentração de 15% v/v HCl.

Figura 6 - Efeito da concentração de HCl na extração dos analitos pelo procedimento proposto.
Concentração de Triton X-100 = 10% m/v.



Fonte: Autora.

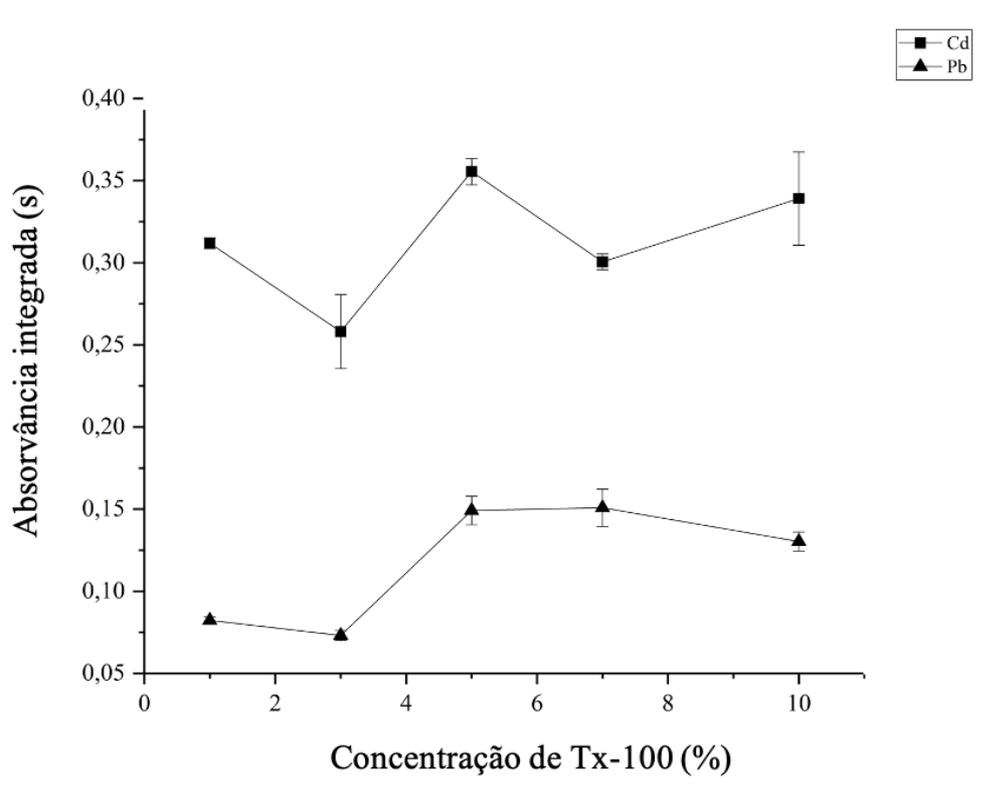
4.1.3 Avaliação da influência da concentração do Triton X-100 empregado na extração dos metais

No preparo de amostras empregando EIBB a concentração usada do emulsificante, como o Triton X-100, deve ser atentamente estudada, uma vez que os tensoativos são agentes estabilizadores da dispersão e, conseqüentemente, retardam a separação das fases. Nesses experimentos, foram aplicadas condições similares aos experimentos anteriores, variando a concentração de Triton X-100 na faixa de 1-10% m/v. Cabe ressaltar que para emulsificar a amostra foi necessário realizar agitação vigorosa da mistura de óleo diluído no solvente (500 mg) com a solução aquosa de Triton X-100 contendo HCl 15 % v/v (2 mL).

Os resultados são mostrados na Figura 7, foram testadas diferentes concentrações de Triton X-100 na fase aquosa, para o Cd a maior absorvância foi observada quando utilizado 5% de surfactante e para o Pb não ocorreu variação significativa na magnitude dos sinais nas concentrações acima de 5 %. Frente aos resultados obtidos, deu-se seguimento aos estudos

utilizando a concentração de 5% (m/v) de surfactante, optou-se pela menor concentração com maior absorvância para assim promover a formação das emulsões de água em óleo, aumentando assim o contato entre a solução aquosa ácida e o óleo.

Figura 7 - Efeito da concentração de Triton X-100 na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v.



Fonte: Autora.

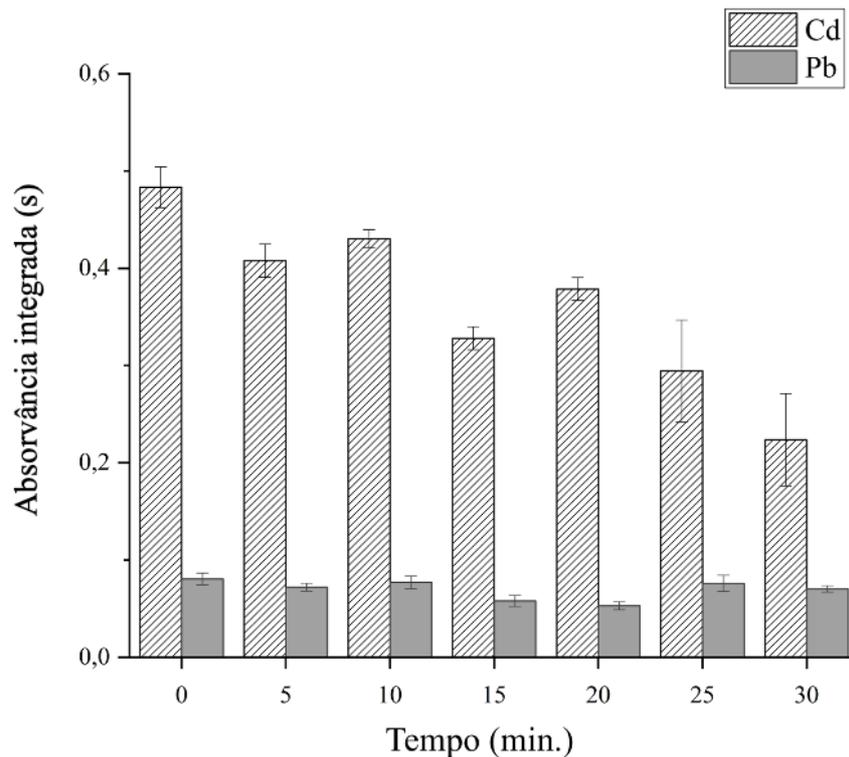
4.1.4 Avaliação da influência do banho de ultrassom empregado na extração dos metais

Algumas técnicas simples e de baixo custo como a agitação manual e a sonicação podem ser aplicadas no preparo de emulsões em escala laboratorial. A energia de ultrassom promove uma emulsificação bastante efetiva, conhecida como emulsificação acústica. O ultrassom facilita a formação de emulsão por aumentar o contato entre as duas fases imiscíveis. A alta eficiência da emulsificação acústica deve-se ao processo de cavitação, onde ocorre a nucleação, o crescimento e o colapso das microbolhas formadas pela propagação das ondas de ultrassom de baixa frequência (<1 MHz) (MAYOTHA, CHANTIRATIKUL, SIRIANGKHAWUT, 2023). Vários estudos utilizando o ultrassom como forma de homogeneizar as emulsões são encontrados na literatura, a exemplo de Trevelin e colaboradores (2016) que determinaram Ba, Ca, Mg e Na em óleo bruto por ICP OES utilizando a EIEB como método de extração. Os

autores diluíram as amostras de óleo em xileno e a solução resultante foi emulsificada com uma solução de Triton X-100 em ácido nítrico. A emulsão foi preparada por agitação em vórtex com posterior exposição ao banho de ultrassom durante 25 minutos.

Neste experimento, aplicou-se a extração com os todos os parâmetros já otimizados e descritos anteriormente, porém após misturar manualmente a solução extratora com a amostra diluída o tempo de ultrassom foi testado entre 0 e 30 minutos. Na sequência do banho de ultrassom, as amostras foram aquecidas a 90 °C durante 15 minutos e depois centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm. A fase aquosa foi coletada para posterior análise de ambos analitos por HR GFAAS e, conforme pode ser observado na Figura 8, a exposição ao banho de ultrassom não aumentou as absorvâncias dos analitos.

Figura 8 - Efeito do tempo de exposição ao banho de ultrassom na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v e TX-100 5% m/v, centrifugação por 15 minutos.



Fonte: Autora.

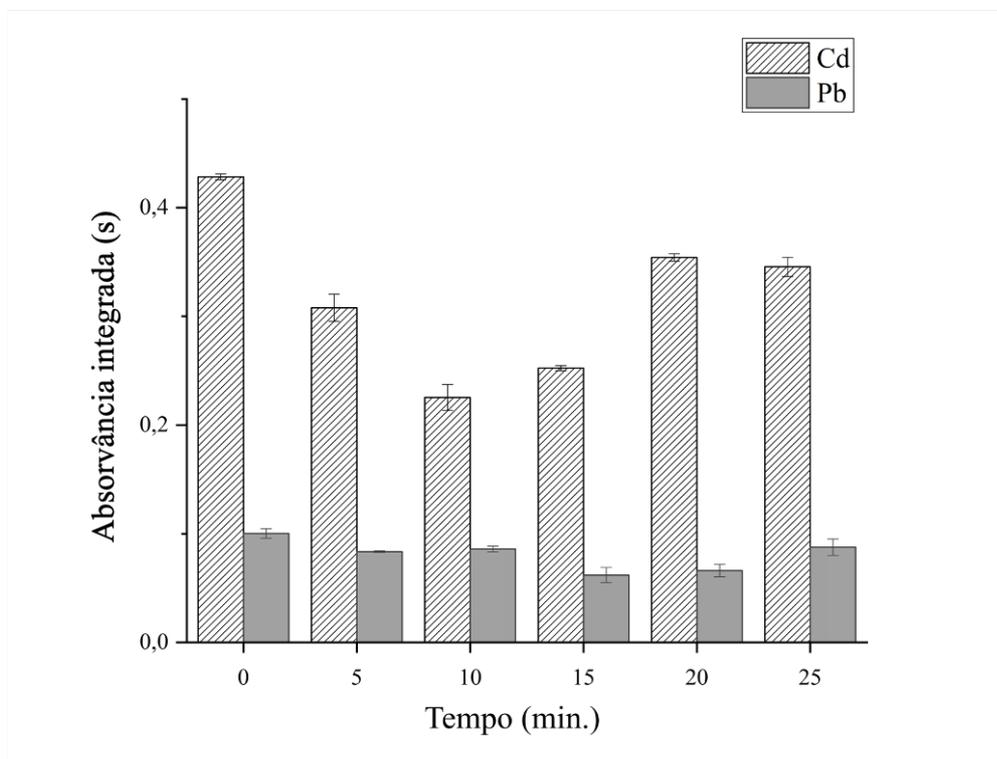
4.1.5 Avaliação do aquecimento e da centrifugação empregado na extração dos metais

Durante o processo de quebra da emulsão por coalescência, que pode ser induzido por aquecimento ou centrifugação, os analitos são transferidos do óleo para a fase aquosa ácida. Assim, neste estudo ambos os procedimentos foram avaliados.

Primeiramente, avaliou-se o tempo de aquecimento que geralmente com o seu aumento ocorre a redução da estabilidade da emulsão, sendo que o processo de desemulsificação se dá em consequência de alterações da tensão interfacial e redução da viscosidade (CHEN, TAO, 2005). Nesse experimento, variou-se o tempo de aquecimento de 0 a 25 minutos em banho maria a 90 ° C. No entanto, conforme pode ser observado na Figura 9, no presente estudo o aquecimento não aumentou significativamente os valores de absorvâncias, evidenciando que a quebra da extração não foi dependente do aquecimento da solução. Assim, frente a estes resultados descartou-se a etapa de aquecimento dos procedimentos posteriores com o objetivo simplificar o método.

Na literatura, há estudos que também não utilizam aquecimento para quebra da emulsão, como He e colaboradores (2015) que realizaram análise multielementar de óleos vegetais por ICP-MS. O método proposto usou solução de Triton x-114 e HNO₃ para formar e emulsão e a quebra foi induzida através de centrifugação.

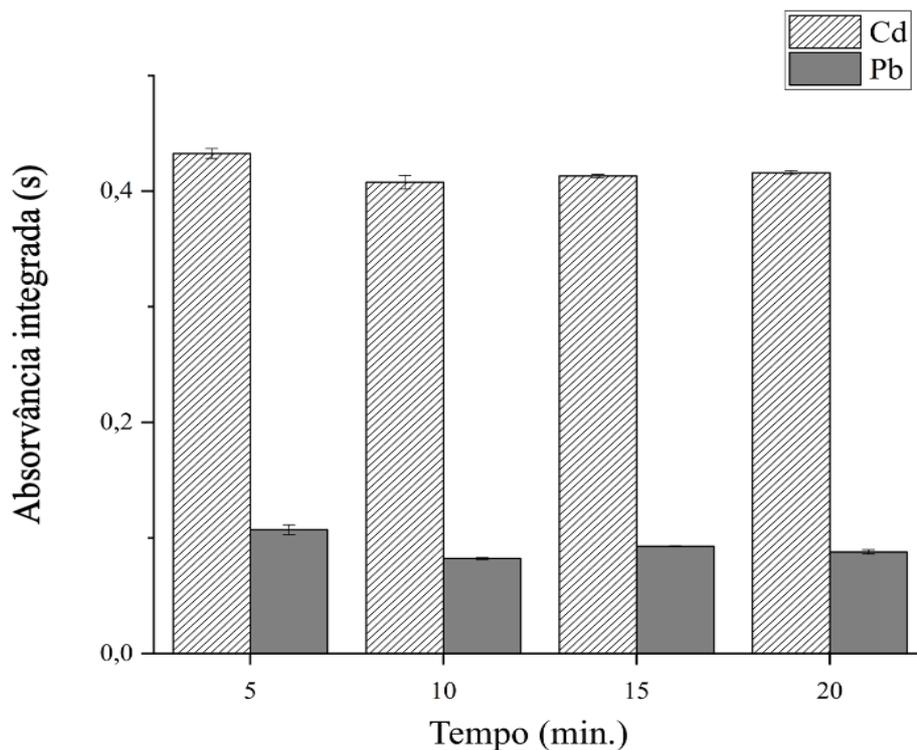
Figura 9 - Efeito do tempo de aquecimento na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v e TX-100 5% m/v, centrifugação por 15 minutos.



Fonte: Autora.

Outro procedimento que pode ser usado para quebra da emulsão é a centrifugação, que em todos experimentos anteriores foi aplicada nas emulsões resultantes durante 15 minutos a 4000 rpm. Nesta fase do estudo, avaliou-se a influência do tempo de centrifugação na separação das fases e nas absorvâncias dos analitos. A indução da quebra da emulsão foi realizada com diferentes tempos de centrifugação (5 a 20 minutos), porém sempre mantendo a rotação de 4000 rpm. A separação conveniente das fases foi observada visualmente já com a aplicação de 5 minutos de centrifugação e a absorvância dos analitos manteve-se inalterada nos diferentes tempos (Figura 10). Assim, com o objetivo de deixar o procedimento mais rápido e simples possível o tempo de centrifugação de 5 minutos foi considerado adequado.

Figura 10 - Efeito do tempo de centrifugação na extração dos analitos pelo procedimento proposto. Concentração de HCl = 15% v/v e TX-100 5% m/v.



Fonte: Autora.

4.2 PROGRAMA DE TEMPERATURA DO FORNO DE GRAFITE

Na determinação de metais por absorção atômica em forno de grafite, o programa de aquecimento é um dos principais parâmetros a ser otimizado para a obtenção de melhores sinais de absorvância.

O comportamento térmico dos analitos nas emulsões foi estudado por meio de curvas de temperatura de pirólise e de atomização. Após a otimização do programa de temperatura foi possível determinar a temperatura máxima permitida na etapa de pirólise sem que ocorra perdas dos analitos, bem como a melhor temperatura de atomização para que não ocorra problemas e reprodutibilidade do sinal.

As temperaturas de pirólise e atomização usados para determinar os analitos em meio aquoso não garantem que o programa de aquecimento esteja otimizado para as emulsões. Por isso, também foram construídas curvas de pirólise e atomização para determinação dos analitos nas amostras preparadas na forma de emulsão uma vez que, é importante observar o comportamento térmico dos elementos de interesse na presença da amostra sob a forma de emulsão. Para a escolha das melhores condições foram consideradas a forma do pico de absorção atômica e a separação do mesmo do sinal de fundo.

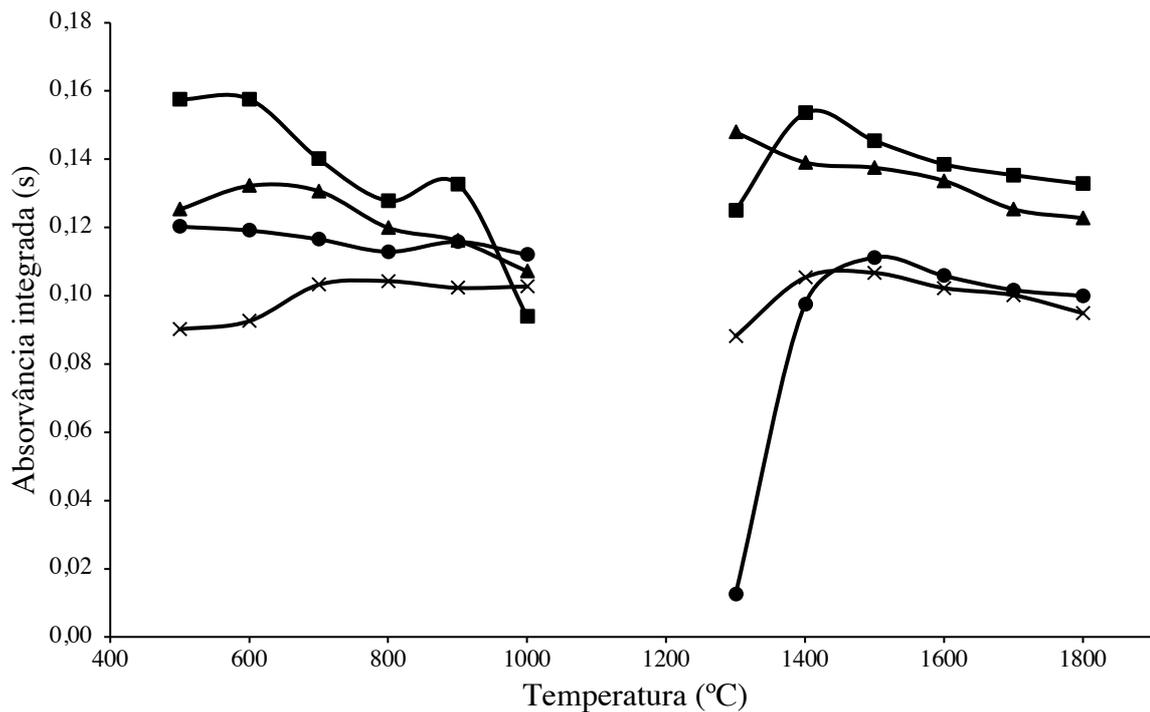
Para a construção das curvas de pirólise e atomização foi usada a solução aquosa obtida após procedimento de quebra de emulsão de 500 mg de amostra (A1) (enriquecida com 0,03 µg/g de cada elemento do estudo). Nitrato de paládio/magnésio foi usado como modificador químico para a obtenção das curvas de pirólise e atomização de Cd e Pb.

Inúmeros elementos já foram utilizados como modificadores químicos convencionais, mas é a mistura nitrato de paládio e nitrato de magnésio a mais utilizada e reconhecida como modificador universal (WELZ, SPERLING, 1999). Estes modificadores foram usados em alimentos e matrizes biológicas diversas (LIMA, KRUG, JACKSON, 1998).

O experimento foi realizado de forma convencional, variando a temperatura de pirólise entre 400 e 1000 °C (temperatura de atomização fixadas em 1500 °C para o Pb e 1200 °C para o Cd) e a temperatura de atomização entre 1100 e 1800 °C (temperaturas de pirólise fixadas no valor escolhido de acordo com o experimento anterior).

Como pode ser observado na Figura 11, as maiores absorvâncias são obtidas quando não se utiliza modificador químico, assim o chumbo se mostrou mais termicamente estável sem modificador químico, sendo a temperatura de pirólise de 600 °C a que se obteve o maior sinal analítico com o perfil mais simétrico. O perfil da curva de atomização para o chumbo mostrou que a melhor sensibilidade, pode ser alcançada quando esses metais são atomizados na temperatura de 1500 °C, onde é observado a maior absorvância com o melhor sinal analítico. Utilizou-se uma etapa adicional de pirólise a 500 °C com gás adicional (oxigênio) para decompor a matriz e assim diminuir a interferência, 15 s foram suficientes para decompor a matriz.

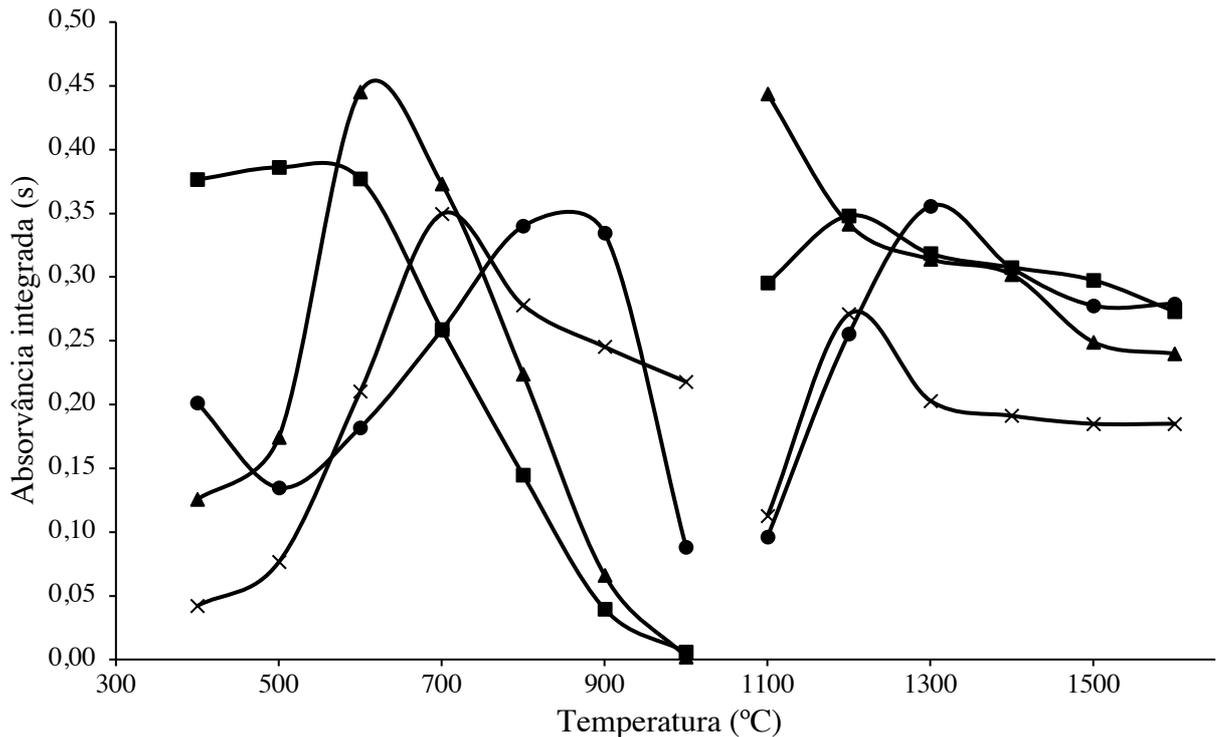
Figura 11 - Curvas de atomização e pirólise para o chumbo em solução padrão aquosa (×) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão com 0,05% $Mg(NO_3)_2/0,1\% Pd(NO_3)_2$; (▲) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão sem modificador; (●) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida com 0,05% $Mg(NO_3)_2/0,1\% Pd(NO_3)_2$; ; (■) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida sem modificador.



Fonte: Autora.

As curvas de pirólise e atomização para avaliar o comportamento térmico do cádmio podem ser observadas na Figura 12. O cádmio se mostrou mais termicamente estável sem modificador para as 3 soluções, com temperatura de 600 °C e 1200 °C, de pirólise e atomização respectivamente. Utilizou-se uma etapa adicional de pirólise a 500 °C com gás adicional (oxigênio) para decompor a matriz e assim diminuir a interferência, 15 s foram suficientes para decompor a matriz.

Figura 12 - Curvas de atomização e pirólise para o cádmio em solução padrão aquosa (×) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão com 0,05% $Mg(NO_3)_2/0,1\% Pd(NO_3)_2$; (▲) absorvância normalizada integrada para 10 ug/L de solução padrão sem modificador; (●) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida com 0,05% $Mg(NO_3)_2/0,1\% Pd(NO_3)_2$; (■) absorvância normalizada integrada para amostra enriquecida sem modificador.



Fonte: Autora.

4.3 FIGURAS DE MÉRITO

Uma forma de identificar a existência de possíveis interferências no desenvolvimento do método foi construir curvas analíticas com padrão aquoso e curvas de adição de padrão nas soluções extraídas, e assim comparar os coeficientes das retas obtidas para cada analito. O método das adições de padrão é frequentemente usado quando a composição da amostra é desconhecida e interferências causadas por concomitantes podem se manifestar.

Foram investigadas nesse trabalho os métodos de calibração com padrões aquosos, curva externa e por matrização. As curvas de calibração foram preparadas em três meios diferentes: (i) calibração externa com o branco, onde o meio é apenas o tolueno seguido do procedimento de extração; (ii) calibração por matrização, onde as curvas foram preparadas

utilizando uma amostra seguida do procedimento de extração e (iii) curva de calibração com H₂O milli-Q e padrões aquosos. As curvas externa e de matrização foram preparadas com padrões aquosos inorgânicos adicionados nas soluções aquosas após a extração.

Os resultados obtidos para os métodos de calibração são demonstrados na Tabela 5, onde pode ser observado que as sensibilidades são diferentes entre a curva apenas com padrões aquosos e as curvas que utilizam extrato, assim analisou-se a sensibilidade entre as curvas externas e as curvas de matrização. Para verificar a equivalência entre os métodos de calibração, foi realizada a comparação das sensibilidades (coeficientes angulares) das curvas de calibração externa e de matrização através de teste estatístico (Student t-test) (ANDRADE *et al.*, 2014). Foram obtidos t_{exp} igual a 6,5 e 6,57 e t_{crit} igual a 4,302 e 4,303 para Pb e Cd, respectivamente, ou seja, foi obtido $t_{exp} > t_{crit}$ para ambos os analitos, indicando que as sensibilidades das curvas são diferentes ($p < 0,05$). Essa diferença pode ter ocorrido devido a um efeito de matriz. Portanto, devido à variação significativa entre as sensibilidades na calibração externa e do extrato obtido com a amostra para Cd e Pb, o método de matrização foi escolhido para a calibração.

Matrização é normalmente o método utilizado para corrigir interferências relacionadas ao efeito de matriz, como interferências físicas, além de reduzir erros devido à extração incompleta. Para evitar essas interferências, a composição do extrato e a solução de calibração devem ser a mesma. Leite e colaboradores (2018) também optaram por utilizar a matrização como método de calibração na determinação de metais em gasolina utilizando EIEB como preparo de amostra.

Tabela 5 - Curvas de calibração com padrão inorgânico utilizando o método de calibração por matrização e calibração externa em HR-CS GF AAS.

Analito	Curva de calibração	Equação da regressão linear	R
Pb	Calibração externa	Abs=0,0121[Pb]+0,0176	0,9933
	Matrização	Abs=0,0108[Pb]+0,0056	0,9959
	Calibração com padrões aquosos	Abs=0,0199[Pb]+0,0219	0,9992
Cd	Calibração externa	Abs=0,0247[Cd]+0,0133	0,9912
	Matrização	Abs=0,0263[Cd]+0,0281	0,9873
	Calibração com padrões aquosos	Abs=0,0477[Cd]+0,0201	0,9986

Fonte: Autora.

Depois da avaliação das curvas de calibração, os parâmetros de mérito foram determinados e podem se observados na Tabela 6. Para os métodos de quantificação de Pb e

Cd foram determinados os parâmetros de validação estipulados pelo capítulo <233> da USP, que são: linearidade, faixa de concentração, limite de quantificação, precisão e exatidão.

A faixa de concentração testada para os métodos foram 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 para ambos os elementos. Os coeficientes de correlação atenderam 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 limite de detecção é definido como a menor concentração que pode ser detectada com um dado nível de confiança e calculado através do desvio padrão de onze leituras do branco multiplicado por três e dividido pela sensibilidade da curva de calibração, sendo LOD calculado desta maneira neste trabalho, utilizando o branco da calibração externa. A massa característica (m_0) é definida como a massa para análise correspondente a absorvância integrada de 0,0044s. As curvas de calibração foram determinadas a partir da solução da amostra extraída e oito concentrações de soluções de padrões aquosos (0 - 20 µg/L).

As massas características estão descritas na Tabela 6, pode-se observar que a m_0 para o Cd apresentou resultado melhor que as concentrações reportadas em outros estudos como Valasques e colaboradores (2020) que determinaram Cd em óleo bruto de palma por GF AAS após extração induzida por quebra de emulsão (m_0 54pg), não foi encontrado nenhum estudo que tenha determinado Pb pela mesma técnica em amostras semelhantes e que descrevesse a m_0 . Para ambos os analitos investigados foram encontrados valores de coeficiente de determinação próximos a 1, o que significa uma boa correção linear entre a absorvância e a concentração.

Tabela 6 - Figuras de mérito para determinação de Cd e Pb em suplementos oleosos usando HR-CS GF AAS.

Parâmetros	Cd	Pb
Faixa analítica ($\mu\text{g} / \text{L}$)	0-20	0-20
Inclinação \pm desvio padrão	$0.0087 \pm 5.0 \times 10^{-4}$	$0.0105 \pm 6,4 \times 10^{-3}$
Intercepto \pm desvio padrão	$0.0246 \pm 6,6 \times 10^{-3}$	$0.0886 \pm 4,5 \times 10^{-3}$
Limite de confiança da inclinação ^b	0,0013	0,0008
Limite de confiança da intercepto	0,0169	0.0115
Coefficiente de correlação (r)	0,9922	0,9975
LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1,51	3,3192
LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5,0364	11,197
m_0 (pg)	10,115	8,381
Análise de variância		
Regressão linear	9582,17 (4,6 ^c)	4781,69 (4,6 ^c)
Desvio de linearidade	21,56 (2,96 ^c)	3,38 (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: Autora.

Os limites de detecção dos métodos propostos apresentaram melhores resultados quando comparados com outros estudos da literatura. Corazza e Tarley (2016) determinaram Cd em suplementos de ômega-3 por TS-FF-AAS após EIEB e reportaram um LOD de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e LOQ 8,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, não há na literatura nenhum estudo que tenha determinado cádmio e chumbo em suplementos oleosos contendo óleo de cártamo e poucos estudos que determinaram em suplementos de ômega. Assim seguiu-se uma comparação do método de extração proposto com outros procedimentos baseados em diferentes abordagens para extração de Cd e Pb em diferentes amostras de óleos vegetais.

Bakircioglu e colaboradores (2015) determinaram Cd em óleos vegetais por FAAS utilizando a EIEB como método de extração e obteve um LOD de 5,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ozzeybek e colaboradores (2020) determinaram Cd em óleo de peixe e de oliva por FAAS após micro extração de fase reversa liquido-liquido e obteve um LOD de 0,75 $\mu\text{g}/\text{L}$, sendo que no nosso estudo o LOD foi de 0,38 $\mu\text{g}/\text{L}$ para Cd. Ansari e colaboradores (2009) determinaram Cd e Pb em óleo de semente de girassol por ETAAS após digestão ácida assistida por micro-ondas e obteve um LOD de 3,38 e 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, para Cd e Pb, respectivamente.

As precisões dos métodos propostos foram avaliadas pela repetibilidade e pela precisão intermediária realizada em três dias diferentes. Os resultados de desvios padrão relativos (DPR) obtidos foram de 10,97 e 6,89 ($n=6$) no ensaio de repetibilidade e de 12,87 e 7,7 ($n=12$) no ensaio de precisão intermediária, para o chumbo e cádmio respectivamente. Os critérios de

aceitação são: $DPR < 20$ ($n=6$) para a repetibilidade; e $DPR < 25$ ($n=12$) para a precisão intermediária (USP, 2017).

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 7. Os resultados para os testes de exatidão contemplaram o critério de aceitação, que é de 70–150% (USP, 2017).

Tabela 7 - 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 (%)	
5	4,821 Pb	5,239 Cd	96,412 Pb	104,775 Cd
10	10,841 Pb	10,607 Cd	108,415 Pb	106,070 Cd
15	14,198 Pb	15,120 Cd	94,655 Pb	100,800 Cd

Fonte: Autora.

4.4 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA

Após o desenvolvimento do método, as condições ótimas obtidas para a formação e quebra das emulsões, foram empregadas para extrair Cd e Pb em 9 amostras de suplementos oleosos, com o objetivo de quantificá-las por HR CS GFAAS.

Como pode ser visto na Tabela 8, foi possível quantificar Cd em 2 amostras e Pb em 1 amostra. As concentrações de Pb e Cd nas demais amostras apresentaram-se abaixo do limite de quantificação dos métodos. A concentração de Cd variou de 8,81 a 9,35 $\mu\text{g/kg}$ e a concentração de Pb encontrada em uma amostra foi de 19,91 $\mu\text{g/kg}$. É importante salientar que a amostra A3 apresentou os dois elementos em estudo.

Tabela 8 - Concentração de cádmio e chumbo em suplementos alimentares oleosos pelo método proposto.

Amostra	Forma de dosagem	Pb		Cd	
		Concentração (µg/g) ^a	Concentração (µg/dia)	Concentração (µg/g) ^a	Concentração (µg/dia)
1	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
3	Cápsula	0,0200±0,0043	0,02	0,0088±0,0004	0,0090
4	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
6	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
7	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
8	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
9	Cápsula	<LOQ	<LOQ	0,0094±0,00002	0,0090

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

*limite diário 10 µg/dia Pb e 5 µg/dia Cd (USP,2017).

Fonte: Autora.

A fim de verificar a aplicabilidade da metodologia proposta nas diferentes composições dos óleos analisados, foi realizado um teste de recuperação, adicionando às amostras concentrações conhecidas dos dois analitos na forma de compostos organometálicos. Em seguida, o método otimizado da EIEB foi aplicado e os resultados foram comparados com aqueles obtidos para as amostras não-enriquecidas. As porcentagens de recuperação foram satisfatórias para os dois analitos em avaliação, indicando que o método proposto foi realmente capaz de extrair os metais das amostras, permitindo assim a sua mensuração nos extratos obtidos. Para o Pb, o percentual de recuperação foi de 108,41 % para amostra contendo óleo de cártamo e 96,73% para a amostra contendo óleo de peixe. Para o Cd, o percentual de recuperação foi de 106,07 % para amostra contendo óleo de cártamo e 103,31% para a amostra contendo óleo de peixe.

Além disso, como forma de eficiência para avaliar a exatidão, todas as amostras desse estudo foram submetidas a digestão ácida, conforme descrito no item 4.7. Aplicou-se uma metodologia de preparo de amostra diferente a fim de avaliar a efetividade da extração, posterior digestão ácida as amostras foram analisadas por HR CS GFAAS. De modo geral, os resultados obtidos encontram-se concordantes com os resultados encontrados com os métodos desenvolvidos nesse trabalho, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultado obtidos na análise de suplementos alimentares oleosos pelo método de preparo proposto e por digestão ácida. As concentrações ($\mu\text{g/g}$) dos analitos são expressas como a média \pm desvio padrão ($n=3$).

Amostra	Forma de dosagem	Pb		Cd	
		Digestão ácida	EIEB	Digestão ácida	EIEB
1	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
3	Cápsula	0,0198 \pm 0,0058	0,02 \pm 0,0043	0,0087 \pm 0,0013	0,0088 \pm 0,0004
4	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
6	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
7	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
8	Cápsula	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
9	Cápsula	<LOQ	<LOQ	0,0092 \pm 0,0001	0,0094 \pm 0,00002

Fonte: Autora.

As concentrações dos metais nas amostras determinadas pela metodologia proposta não foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos pelo método de digestão ácida a um nível de confiança de 95% quando o teste t-Student foi aplicado. A fim de confirmar que a digestão ácida estava extraíndo os analitos presentes nas amostras foi realizado um teste de recuperação, adicionando às amostras concentrações conhecidas dos dois analitos na forma de compostos organometálicos. Em seguida, as amostras foram analisadas por HR CS GFAAS e os resultados foram comparados com aqueles obtidos para as amostras não-enriquecidas. As porcentagens de recuperação foram satisfatórias para os dois analitos em avaliação, indicando que a digestão ácida foi realmente capaz de extrair os metais das amostras. Para o Pb, o percentual de recuperação foi de 106,6 % para amostra contendo óleo de cártamo e 108 % para a amostra contendo óleo de peixe. Para o Cd, o percentual de recuperação foi de 113,61 % para amostra contendo óleo de cártamo e 116,87% para a amostra contendo óleo de peixe.

Conforme o capítulo 2232 da Farmacopeia Americana (USP, 2017d), o limite para chumbo em suplementos alimentares é de 10 $\mu\text{g}/\text{dia}$. O limite para cádmio em suplementos alimentares pela USP é de 5 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Nenhuma das amostras analisadas tiveram resultados acima do permitido. Apesar disso a exposição crônica a altos níveis desses metais tóxicos pode causar uma variedade de efeitos adversos à saúde.

5 CONCLUSÃO

O preparo de amostra por meio da obtenção de emulsão de suplementos alimentares oleosos constituiu um procedimento simples e rápido, que possibilitou o mínimo de manipulação da amostra, favorecendo a redução de contaminações e perdas de analito por volatilização, uma vez que as amostras não foram submetidas ao aquecimento convencional na etapa de preparo.

A calibração por matrização com soluções padrão em meio aquoso foi a estratégia utilizada para corrigir os efeitos de matriz (interferência). Os parâmetros de confiabilidade analítica como sensibilidade, coeficientes de correlação linear, limites de detecção e de quantificação, massas características e desvios padrões relativos (%) RSD obtidos para a determinação de Cd e Pb em suplementos oleosos por espectrometria de absorção atômica de alta resolução em forno de grafite utilizando a calibração por matrização foram satisfatórios.

Os teores de Cd e Pb determinados nas amostras de suplementos oleosos pelos métodos propostos neste estudo foram semelhantes daqueles obtidos pelo procedimento de digestão ácida em bloco digestor, ao nível de 95% de confiança.

As amostras analisadas neste estudo não apresentaram contaminação de chumbo e cádmio, de acordo com os limites estabelecidos pela farmacopeia americana, mostrando que os produtos são seguros para o consumo da população. No entanto a contaminação de suplementos alimentares oleosos por estes elementos é preocupante, mesmo em baixas concentrações uma vez que a exposição crônica pode causar graves efeitos deletérios à saúde.

A simplicidade dos métodos propostos, a utilização de baixos volumes de solventes e custo relativo no preparo das soluções tornam estas metodologias bastantes atraentes em determinações de rotina, além do caráter inédito em relação a determinação de impurezas elementares em amostras de suplementos contendo óleo de cártamo pelas técnicas de HR CS GFAAS após EIEB.

REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F.; *et al.*, Morfologia de Sementes e Plântulas de Cártamos. **Revista Ciência. Agrônômica**, v.41, n.2, p.259-265, 2010.
- ADOLFO, F. R. *et al.* Simultaneous determination of iron and nickel as contaminants in multimineral and multivitamin supplements by solid sampling HR-CS GF AAS, **Talanta**, v. 195, p. 745-751, 2019.
- AHN, J. *et al.* Occupational Lead Exposure and Brain Tumors: Systematic Review and Meta-Analysis. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 17, p. 3975, 2020.
- ALLAHAR, K. N, *et al.* Impedance of steels in new and degraded ester based lubricating oil. **Electrochim. Acta.**, v. 51, p.1497-1504, 2006.
- AMAI, R. S.; GARCIA, E. E.; MONTEIRO, M. R.; NÓBREGA, J. A. Determination of Ca, Mg, and Zn in biodiesel microemulsions by FAAS using discrete nebulization. **Fuel**, v. 93, p. 167-171, 2012.
- AMARIEI, S.; GHEORGHE, G.; OROIAN, M. Study on Toxic Metal Levels in Food Supplements. *Rev. chim.*, v. 68, p. 1298-1301, 2017.
- AMPEM, G. *et al.* The impact of partial oil substitution and trace metal ions on the evolution of peroxidation products in thermally stressed culinary oils. *Food Chemistry*, v. 375, 2022.
- ANDARGIE, M. *et al* Lignans of Sesame (*Sesamum indicum* L.): A comprehensive Review. **Molecules**, v. 26, p. 883, 2021.
- ANDRADE, J. M.; ESTÉVEZ-PÉREZ, M. G. Statistical comparison of the slopes of two regression lines: A tutorial. **Anal. Chim. Acta.**, v. 838, p. 1-12, 2014
- ANSARI, R. *et al* Q. Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. **Food Chemistry**, 11, 318-323, 2009.
- ARANAZ, P. *et al.* A combination of borage seed oil and quercetin reduces fat accumulation and improves insulin sensitivity in obese rats. **Food Funct.**, v. 11, p. 4512-4524, 2020.
- ASP, M. L., *et al.* Time dependent effects of safflower oil to improve glycemia, inflammation and blood lipids in obese, post menopausal women with type 2 diabetes: a randomized, double masked, crossover study. **Clinical Nutrition**, v. 30, p. 443-449, 2011.
- AUCÉLIO, R. Q. *et al* The determination of trace metals in lubricating oils by atomic spectrometry. **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 62, p. 952-961, 2007.
- BAHMANI, M. *et al* Obesity Phytotherapy: Review of Native Herbs Used in Traditional Medicine for Obesity. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v.21, n.3, p.228-34, 2016.
- BAKIRCIOGLU, D.; TOPRAKSEVER, N.; KURTULUS, Y. B. Separation/Preconcentration System Based on Emulsion-Induced Breaking Procedure for Determination of Cadmium in Edible Oil Samples by Flow Injection-Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 2178-2184, 2015.

BALDO, M. A. *et al* P. Electrochemical preconcentration coupled with spectroscopic techniques for trace lead analysis in olive oils, **Talanta**, v. 210, p. 120667, 2020.

BARROS, A. I.; DE OLIVEIRA, A. P.; DE MAGALHÃES, M. R. L.; VILLA, R. D. Determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry, with dissolution in ethanol as a single sample preparation step. **Fuel**, v. 93, p. 381-384, 2012.

BEGU, E.; SNELL, B.; ARSLAN, Z. Simultaneous separation of arsenic and cadmium from interfering salt matrix of multivitamin/mineral supplements by sequential coprecipitation and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 4112-418, 2019.

BELTRÁN, B. G. *et al*. Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy (TXRF) Method Validation: Determination of Heavy Metals in Dietary Supplements, *Journal of Chemistry*, v.2020, p. 1-9, 2020.

BRASIL, ANVISA, Agência Nacional de vigilância sanitária. Suplementos alimentares ganham regulamentação inédita. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/suplementos-alimentares-ganham-regulamentacao-inedita> Acessado em: 12/01/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília: Ministério da Saúde, p.148, 2011.

BRASIL, Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamentação nº 243/2018. Dispõe sobre os requerimentos para os suplementos. Diário oficial da Republica federativa do Brasil, 27 de julho de 2018.

BOR, T. H.; CHEN, Y. C.; YING, C. C.; KAI, Y. C. Relationship between the level of essential metal elements in human hair and coronary heart disease. **J Radioanal Nucl Chem**, v. 290, p. 165-169, 2011.

BORGES, D. L. G. *et al*. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, n.18, p. 58-67, 2005.

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

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.

CALDAS, L. F. S. *et al*. Application of the extraction induced by emulsion breaking for the determination of Cu, Fe and Mn in used lubricating oils by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 110, p. 21-27, 2013.

CALDAS, L. F. S. *et al*. Multivariate optimization of a spectrophotometric method for copper determination in Brazilian sugar-cane spirits using the Doehlert design. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 118-124, 2011.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Braz J Med Biol Res.**, v.36, n.4, p.433, 2003.

- CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, p.1105-1115, 2017.
- CASTILLO, J. R.; JIMÉNEZ, M. S.; EBDON, L. Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 1515-1518, 1999.
- CASTRO, V. R. *et al.* Evaluation of the oleochemical quality of sesame seeds (*Sesamum indicum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Research Society and Development**, v.10 , p.e3510716226, 2021.
- COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) no 629/2008, de 02 de julho 2008. Altera o Regulamento (CE) no 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 3 de Julho de 2008. p. 6 – 9.
- CERQUEIRA, U. M. F. *et al.* Extraction Induced by Emulsion Breaking for Ca, Fe, Mg, and Zn Determination in Edible Oils Using High-Resolution Continuous Source Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v. 15, p. 1098–1106, 2022.
- CHAMPAGNE, A. B.; EMMEL, K. V. Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 216–223, 2011.
- CHARKIEWICZ, A. E.; BACKSTRAND, J. R. Lead Toxicity and Pollution in Poland; **Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 4385, 2020.
- CHEN, G.; TAO, D. An experimental study of stability of oil-water emulsion. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 409-508, 2005.
- CHEN, G. *et al.* Association of Oily and Nonoily Fish Consumption and Fish Oil Supplements with Incident Type 2 Diabetes: A Large Population-Based Prospective Study. **Diabetes Care**, v.44, p. 672–680, 2021.
- CHILOV, S. Determination of small amounts of mercury. **Talanta**, v. 22, p. 205- 232, 1975.
- CODEX STAN 193-1995, 2010. Codex General Standard for Contaminants and Toxins in food and feed, Adotada em 1995 (Revisada em 1997, 2006, 2008, 2009 e emendada em 2010). Disponível em: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf
- CORAZZA, M. Z.; TARLEY, C.R.T. Development and feasibility of emulsion breaking method for the extraction of cadmium from omega-3 dietary supplements and determination by flow injections TS-FF-AAS. **Microchemical Journal**, v. 127, p. 145-151, 2016.
- COSTA, C. S. *et al.* Characterization and oxidative stability of brown flaxseed oil and flour (*Linum usitatissimum* L.) **Research, Society and Development**, v. 9, p. 917909439, 2020.
- CRUZADO, J. *et al.* Vitamina E em el tratamiento de la tuberculosis pulmonar. **Acta Médica Orreugiana Hampi Runa**, v. 19, p. 11-18, 2019.
- CUSTÓDIO, V. I C. *et al.* Vitamin E deficiency and associated factors among Brazilian school children, **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 53, p. 424-429, 2020.

ĆWIELAG-DRABEK, M. *et al.* Health risks from consumption of medicinal plant dietary supplements. **Food Sci Nutr.**, v. 00, p. 1-10, 2020.

DAMAK, F. *et al.* Comparison of Sample Preparation Methods for Multielements Analysis of Olive Oil by ICP-MS. **Methods and Protocols**, v. 2, p. 72, 2019.

DE ATAIDES, E. C. *et al.* Acute Liver Failure Induce by Carthamus tintorius oil: Case Reports and Literature Review. **Transplantation Proceeding**, v. 50, p. 476-477, 2018.

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

DEMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

DELPINO, F. M. *et al.* Omega -3 supplementation and diabetes: A systematic review and meta-analysis, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.

DOMINGUES, B. C. L.; RIBEIRO, T. R.; NEVES, A. L.; NAILTON, M. N. J. Food supplements: Chemical aspects and applications of macro and micronutrients. **Rev. Virtual Quim.**, p. 1-41. 2022.

DOS SANTOS, C. C. C.; OLIVEIRA, K. N. D.; CHAVES, E. D. Adverse effects of inappropriate use of dietary supplements, **Research, Society and Development**, v. 12, e 12412239016, 2023.

ELGAMMAL, S. M.; KHORSHED, M. A.; ISMAIL, H. E. Determination of heavy metal content in whey protein samples from markets in Giza, Egypt, using inductively coupled plasma optical emission spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry: A probabilistic risk assessment study, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, 2019.

ESKINA, V. V. *et al.* Direct precise determination of Pd, Pt and Rh in spent automobile catalysts solution by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 165, p. 105784, 2020.

FDA, Food and Drug Administration. Questions and Answers on Dietary Supplements. US, 2019. Disponível em: http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/usingdietarysupplements/ucm480069.htm#what_is . Acessado em: 12 janeiro 2021.

FERNANDO, W. M. *et al.* The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. **Br J Nutr**, v.114, n.1, p.1-14, 2015.

FERNANDES, A. *et al.* Microextraction Induced by Emulsion Break (MIEB): A Practical Option for the Preparation of Diesel Oil Samples for Determination of Cu, Ni and Pb by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Rev. Virtual Quim.**, v. 14, p. 769-777, 2022.

FERNANDES, D. A. *et al.* Fatty Acids Analysis and chemotaxonomic considerations of Malvoideae (Malvaceae) Species. **Quimica Nova**, v. 44, 2021.

FRIBERG, L.T.; ELINDER, G.G.; KJELLSTROM, T.; NORDBER, G.F. (Eds.) Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal: Volume 2: Effects and Response (Vol. 1); CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2019.

GAB-ALLAH, M. A.; GODA, E. S.; SHEHATA, A. B.; GAMAL, H. Critical Review on the Analytical Methods for the Determination of Sulfur and Trace Elements in Crude Oil, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 161-178, 2019.

GAO, L. N.; CUI, Y. L.; FAN, G. W.; WANG, Y.F. Protective effect of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* extract against lipopolysaccharide induced liver injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, p. 9079-9092, 2015.

GAO, Y. *et al.* Snack foods and lead ingestion risks for school aged children: A comparative evaluation of potentially toxic metals and children's exposure response of blood lead, copper and zinc levels. **Chemosphere**, v. 261, p. 127547, 2020.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Omega-3 and 6 fatty acids balance in inflammatory response in patients with cancer and cachexia. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 611–621, 2006.

GENCHI, G. *et al.* The Effects of Cadmium Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 3782, 2020.

GILARD, V. *et al.* Detection, identification and quantification by ¹H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 476–493, 2015.

GÓMEZ-NIETO, B.; GISMERA, M. J.; SEVILLA, M. T.; PROCOPIO, J. R. Determination of essential elements in beverages, herbal infusions and dietary supplements using a new straightforward sequential approach based on flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 219, p. 69–75, 2017.

GRANDINI, N. A. *et al.* The action of fish oil supplements in the technical repair of injured mice. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 26130-26143, 2020.

HAWKEY E., NIGG J. T. Omega-3 Fatty Acid and ADHD: Blood Level Analysis and Meta-Analytic Extension of Supplementation Trials. **Clin Psychol Rev.**, v. 34, n.6, p. 496-505, 2014.

HE, Y.M. *et al.* Extraction induced by emulsion breaking as a tool for simultaneous multi-element determination in used lubricating oils by ICP-MS. **Anal. Methods**, v. 7, p. 4493– 4501, 2015.

HIGGINS, M. R.; IZADI, A.; KAVIANI, M. Antioxidants and exercise performance: with a focus on Vitamin E and C supplementation. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 17, p. 8452, 2020.

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

IEGGLI, C. V. S., BOHRER, D., DO NASCIMENTO, P. C., CARVALHO, L. C., Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable

oils, margarine and butter after sample emulsification, **Food Addit. Contam. Part B.** v. 28, p. 640–648, 2011.

JAIROUN, A. A.; SHAHWAN, M.; ZYOUN, S. H. Heavy Metal contamination of Dietary Supplements products available in the UAE markets and the associated risk, **Scientific reports**, v. 10, p. 18824, 2020.

KABATA-PENDIAS, A.; SZTEKE, B. Trace Elements in Abiotic and Biotic Environments; **CRC Press: Boca Raton, FL, USA**, 2015.

KARASAKAL, A. Determination of Trace and Major Elements in Vegan Milk and Oils by ICP-OES After Microwave Digestion. **Biol Trace Elem Res.**, v. 197, p. 683–693, 2020.

KESHVARI, M. *et al.* Assesment of heavy metal contamination in herbal medicinal products consumed in the Iranian market, *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, p. 33208-33218, 2021.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B.; **Introduction to Microwave Sample Preparation - Theory and Practice**, Washington: ACS Professional Reference Book, 1988.

KORN, M. *et al.* Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels – A review. **Talanta**, v. 73, p. 1–11, 2007.

KOYAMA N. *et al.*, Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Agric Food Chem.** v. 54, p. 4970-4976, 2006.

KRUG, F. J. Métodos de prepare de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª ed. Piracicaba: F. J. Krug, p. 340, 2008.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P.; Métodos de preparo de amostras para análise elementar, 2 edição, EditSBQ, São Paulo, 2016.

KUMAR, A. *et al.* Lead Toxicity: Health Hazards, Influence on Food Chain and Sustainable Remediation Approache. **Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 2179, 2020.

KUMAR, S.; SHARMA, A. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility, **Rev. Environ. Health**, v. 34, p. 327-338, 2019.

LEAL, G. C. *et al.* Determination of Lead in Dietary Supplements by Higj-Resolution Continuum-Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry with Direct Solid Sampling. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 86, p. 103360, 2020.

LEE, G. Y.; HAN, S. N. Review: The role of Vitamin E in Immunity. **Nutrients**, v. 10, p. 1614, 2018.

LEITE, C. C. *et al.* Extraction method based on emulsion breaking for the determination of Cu, Fe and Pb in Brazilian automotive gasoline samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 142, p. 62–67, 2018.

LETRO, C. B. *et al.* Ômega-3 e doenças cardiovasculares: uma revisão à luz das atuais recomendações. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 26, e7398, 2022.

LI, K. *et al.* Simple dilution for direct determination of trace nickel in crude oil with miniaturized electrothermal atomic absorption spectrometer, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 35, p. 2656-2662, 2020.

LIMA, E. C.; KRUG, J. F.; JACKSON, W. K., Evaluation of tungsten- rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead, and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 53, p. 1791-1804, 1998.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. *et al.* Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1257-1262, 2011.

MAGALHÃES, A. C. R. *et al.* A vessel-inside-vessel microwave-assisted digestion method based on SO₃ generation *in situ* for the mineral determination of fatty samples. **Talanta**, v. 226, p. 122094, 2021.

MARTÍNEZ, S.; SÁNCHEZ, R.; LEFEVRE, J.; TODOLÍ, J. L. Multielemental analysis of vegetable oils and fats by means of ICP-OES following a dilution and shot methodology, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 35, p.1897-1909, 2020.

MAYOTHA, P., CHANTIRATIKUL, P., SIRIANGKHAWUT, W. Sequential ultrasound-assisted digestion procedure for determination of cadmium and lead contaminants in sea grapes and some seaweed products. **Food Measure** 17, 607–614 (2023).

MENDIL, D.; ULUÖZLÜ, O. D.; TÜZEN, M.; SOYLAK, M. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p.724-728, 2009.

MEZYNSKA, M.; BRZÓSKA, M.M. Environmental exposure to cadmium—A risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 25, p. 3211– 3232, 2018.

MOHAJER, A. *et al.* Determination and Health Risk Assessment of Heavy Metals in Imported Rice Bran Oil in Iran, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 86, p. 103384, 2019.

MOHAMED, A. F.; DIAAELDIN, M. E.; SHERIF, M. A. Outgoing and potential trends of the omega-3 rich linseed oil quality characteristics and rancidity management: A comprehensive review for maximizing its food and nutraceutical application. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 292-309, 2021.

MOHAMED, R.; ZAINUDIN, B. H.; YAAKOB, A. S. Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry, **Food Chemistry**, v. 303, p. 125392, 2020.

MOHAJER, A. *et al.* Determination and health risk assessment of heavy metals in imported rice bran oil in Iran, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 86, p. 103384, 2020.

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, p. 119–129, 2004.

MORI, T. A. Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. **Fitoterapia**, v. 123, p. 51-58, 2017.

MUKHAMETOV, A. E. *et al.* Heavy metal Contents in Vegetable Oils of Kazakhstan Origin and Life Risk Assessment. **Agricultural and Biosystems Engineering**, v. 14, p. 163-167, 2020.

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, n. 1/2, p. 83-100, 2006.

MUSCHIETTI, L.; REDKO, F.; ULLOA, J. Adulterants in selected dietary supplements and their detection methods. **Drug Test Anal.**, v. 12, p. 861– 886, 2020.

MUSTATEA, G. *et al.* Risk Assessment of Lead and Cadmium in Some Food Supplements Available on the Romanian Market, **Foods**, v. 10, p. 1-12, 2021.

NANDASIRI, R. *et al.* Optimization of Canolol Production from Canola Meal Using Microwave Digestion as a Pre-Treatment Method. **Foods**, v. 12, p. 318, 2023.

NASCIMENTO, P. M.; SCALABRINI, H. M. Benefits of Omega 3 in Cardiovascular Disease Prevention: Integrative Literature Review. **International Journal of Nutrology**, v. 13, p. 95-101, 2020.

NEHER, B. *et al.* Nutritional analysis of Spirulina dietary supplements: Optimization procedure of ultrasound-assisted digestion for multielemental determination. **Food Chemistry**, v. 257, p. 295-301, 2018.

NUNES, L. S. *et al.* Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. **Food Chemistry**, v. 127, p. 780-783, 2011.

NYARADI, A. *et al.* The role of nutrition in children's neurocognitive development, from pregnancy through childhood. **Frontiers in Human Neuroscience**, v.7, p.97, 2013.

OZZEYBEK, G.; SAHIN, I.; ERARPAT, S.; BAKIRDERE, S. Reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction coupled to slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry as a new analytical strategy for trace determination of cadmium in fish and olive oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.90, p. 103486, 2020.

PANGGABEAN, A. S.; SILABAN, H. S.; PASARIBU, S. P.; ALIMUDDIN. Method validation of Cadmium (II) determination in lubrication oil by direct dilution method using atomic absorption spectrophotometer, *Journal of Physics: Conference Series*, v. 1277, 2019.

PELIZZETTE, E.; PRAMAURO, E. Analytical Applications of organized molecular assemblies. **Analytica Chimica Acta**, v. 169, p. 1–29, 1985.

PEREIRA, T. V.; CASSELLA, R. J. Simple Spectrophotometric Determination of Iron in Diesel Oil after Sample Preparation Employing Extraction Induced by Emulsion Breaking, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 33, p.1236-1243, 2022.

PINHEIRO, F. C. *et al.* Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 471-478, 2019.

POSCIC, F. *et al.* Removal of pomace residues is critical in quantification of element concentrations in extra virgin olive oil. **J. Food. Compos. Anal.**, v. 77, p. 39–46, 2019.

RAMIREZ-TORTOSA, C. L. *et al.*, Longevity and cause of death in male Wistar rats fed lifelong diets based on virgin olive oil, sunflower oil or fish oil. **The Journal of Gerontology: Series A**, v. 75, p. 442-452, 2020.

ROBAINA, N. F; BRUM, D. M.; CASSELLA R. J. Application of the extration induced by emulsion breaking for the determination of chromium and manganese in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry, **Talanta**. v. 99, p. 104-112, 2012.

ROUNIZI, S. K. *et al.* The chemical composition and heavy metal content of sesame oil produced by different methods: A risk assessment study. **Food Sci Nutr.**, v. 9, p. 2886-2893, 2021.

RUSS, D. W. *et al.* Dietary fish oil supplement induces age specific contractile and proteomic responses in muscles of male rats, **Lipids in Health and Disease**, v. 19, p. 195, 2020.

SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ, C.; LIEMEMANN, C. P.; TODOLI, J. L. Metal and metalloid determination in biodiesel and bioethanol. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 30, p. 64-101, 2015.

SANTANA *et al.* Óleo de Cártamo (*Carthamus Tinctorius*) aumenta os níveis de colesterol total e LDL-colesterol em modelo experimental de síndrome metabólica, **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, p. 476-483, 2017.

SANTOS, L. K. B. *et al.* Evaluation of nutritional labeling and quality of omega fatty acid supplements. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 29, n.2, p. 20-24, 2020.

SATARUG, S. Dietary Cadmium intake and its effects on kidneys. **Toxics** 2018, 6, 15.

SCHERRATT, S. C. R.; LERO, M.; MASON, R. P. Are dietary fish oil supplements appropriate for dyslipidemia management? A review of the evidence. **Current Opinion in Lipidology**, v. 31, p. 94-100, 2020.

SCHULZE, B. N.; SCHULTZ, C.; ULBRICH, A. Z.; BERTIN, R. L. Effect os Supplementation with Safflower Oil on the Anthropometric and Lipid Profiles of Women with Excess Weight Practicing Physical Exercise. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 18, p. 89-96, 2014.

SHAH, N.; SOYLAK, M. Advanced Methodologies for Trace Elements in Edible Oil Samples: A Review, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 1572-1582, 2022.

SILVA, C. M. et al. Vitamin C for boosting immunity: beneficial effects and adverse effects, **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, 2022.

SOUZA, V. S. *et al.* Development of a Methodology Based on Extraction Induced by Emulsion Breaking for Copper Determination in Gasohol by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 32, p. 329-336, 2021.

STEENLAND, K. *et al.* Cancer incidence among workers with blood lead measurements in two countries. **Occup. Environ. Med.**, v. 76, p. 603–610, 2019.

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.

TAGHIZADEH, S. F. *et al.* Exploring the carcinogenic and non-carcinogenic risk of chemicals present in vegetable oils, **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 102, p. 5756-5784, 2020.

TAGHIZADEH, S. F. *et al.* Assessment of Carcinogenic and Non-carcinogenic Risk of Exposure to Metals via Consumption of Coffee, Tea, and Herbal Tea in Iranians. **Biological Trace Element Research**, v. 201, p. 1520-1537, 2022.

TANWAR, B.; GOYAL, A. Oilseed: Health Attributes and Food Applications. **Springer, Singapore**, p. 351-371, 2021.

TINKOV, A.A *et al.* Gut as a target for cadmium toxicity. **Environ. Pollut.** v.235, p. 429–434, 2018 a.

TINKOV, A.A *et al.* Cadmium and atherosclerosis: A review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies. **Environ. Res.**, v. 62, p. 240–260, 2018 b.

TRINDADE, A. S. N. *et al.* Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 185, p. 145-150, 2015.

TREVELIN, A. M. *et al.* Extraction induced by emulsion breaking for determination of Ba, Ca, Mg and Na in crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 338-343, 2016.

ULLAH, R. *et al.* Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. **J Food Sci Technol**. v. 53, p.1750-1758, 2016.

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 Impurities in Dietary Supplements, USP 40-NF 35, 2017d.

VALASQUE, G. S. *et al.* Applications of emulsified systems in elemental analysis by spectroanalytical techniques. **Appl. Spectrosc. Rev.**, v. 52, p.729, 2017.

VALASQUE, G. S. *et al.* Multivariate optimization for the determination of cadmium and lead in crude palm oil by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction induced by emulsion breaking. **Microchemical Journal**, v. 153, p. 104401, 2020.

VAREDA, J. P.; VALENTE, A. J. M.; DURÃES, L. Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review, **Journal of Environmental Management**, v. 246, p. 101-118, 2019.

VAZ, D. S. S. *et al.* A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. **Uningá Review Journal**, Maringá, v. 20, n. 2, p.48-54, 2014.

VIANA, C.; BOHRER, D.; CARVALHO, L. M.; DO NASCIMENTO, P. C. Emulsified systems for metal determination by spectrometric methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 49-59, 2014.

VOSOUGHKIA, M. *et al.* Evaluation of oil content and fatty acid composition in seeds of different genotypes of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Int J Agric Sci Res.** v. 2, p.59-66, 2011.

WANI, A.L.; ARA, A.; USMANI, J.A. Lead toxicity: A review. **Int. Toxicol.** 2015, v, 8, p. 55-64, 2015.

WEBER, M. G.; BRANDT, R.; OLIVOTO, R. R.; FLORES, L. J. F. Musculação e suplementação; Perfil dos consumidores de suplementos alimentares nas academias de Palotina-PR, **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo. v. 12, p. 852-861, 2018.

WELZ, B.; HE, Y. H.; SPERLING, M. Flow-injection online acid digestion and pre-reduction of arsenic for hydride generation atomic-absorption spectrometry - a feasibility study. **Talanta**, v. 40, p. 1917-926, 1993.

WELZ, B.; SPERLING, M.; **Atomic Absorption Spectrometry**, 3^{ed.}, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

WELZ, B. *et al.* High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry- What can we expect? **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, p.220-229, 2003.

WELZ, B. *et al.* Continuum source atomic absorption spectrometry: Past, present and future aspects-a critical review. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, p. 799, 2014.

WHITE, CM. Continued Risk of Dietary Supplements Adulterated with Approved and Unapproved Drugs: Assessment of the US Food and Drug Administration's Tainted Supplements Database 2007 Through 2021. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, p. 928-934, 2022.

WU, S. *et al.* Carthamus red from *Carthamus tinctorius* L. exerts antioxidant and hepatoprotective effect against CCl₄ induced liver damage in rats via the Nrf2 pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 570-578, 2013.

WUYKE, H.; OROPEZA, T.; FEO, L. Extration induced by emulsion breaking for the determination of AS, Co, Cr, Mn, Mo and Pb in heavy and extra-heavy crude oil samples by ICP-MS. **Analytical Methods**, v.9, p. 1152-1160, 2017.

YASEEN, G. *et al.* Chapter 15- Sesame (*Sesamum indicum* L.). **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**, p. 253-269, 2021.

YAO, Y. *et al.* Quantification and Risk Assessment of Lead, Cadmium, Arsenic and Other Harmful Metals in Calcium Supplements in China. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 11, p. 150-157, 2023.

YATES, C.; CALDER, P. C.; RAINGER, G. E. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease, **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 3, p. 272-282, 2014.

XIA, Q. *et al.* Review on contaminants in edible oil and analytical technologies, **Oil Crop Science**, v. 6, p. 23-27, 2021.

ZHAO, L. L. *et al.* Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development in vitro. **Journal Plos One**, v. 12, p. 1-12, 2017.

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

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Título: *Emulsion breaking-induced extraction of Cd and pb from oily dietary supplements followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry detection.* Autores: Gabriela Camera Leal, Franciele Rovasi, Maiara Maziero, Paulo Cícero do Nascimento, Leandro Machado de Carvalho, Carine Viana. Publicado na revista *Food Composition and Analysis*, volume 112, em 2022.

Journal of Food Composition and Analysis 112 (2022) 104651



Emulsion breaking-induced extraction of Cd and Pb from oily dietary supplements followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry detection

Gabriela Camera Leal^{a,*}, Franciele Rovasi^b, Maiara Maziero^a, Paulo Cícero do Nascimento^{b,c}, Leandro Machado de Carvalho^{b,c}, Carine Viana^{a,d,**}

^a Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^c Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^d Department of chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Edible oils
Dietary supplements
Metals
Sample preparation
HR-CS GFAAS
Emulsion breaking
Food composition

ABSTRACT

A method is described for the determination of cadmium (Cd) and lead (Pb) in oily dietary supplements using extraction induced by emulsion breaking (EIEB) and high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GFAAS). The method is based on the formation of a water-in-oil emulsion by the addition of an extractor solution consisting of 5% (w/v) Triton X-100 and 15% (v/v) hydrochloric acid (HCl) to the sample of oil diluted with 1.5 mL of toluene and the breakage of this emulsion by centrifugation (4000 rpm for 5 min). Two well-defined phases were formed and the acid aqueous phase containing extracted Cd and Pb ions was analyzed by HR-CS GFAAS. Different parameters that influence the extraction efficiency of Cd and Pb were optimized univariately. The detection limits were 3.32 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for Pb and 1.51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for Cd. A matrix-based calibration method was applied to compensate for the interference caused by the matrix effects. The Cd concentration in the samples ranged from 8.81 to 9.35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the highest concentration of Pb was 19.91 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The proposed preparation of sample through extraction by breaking emulsions of oily dietary supplements proved to be a simple and efficient strategy to determine the amount of Pb and Cd by HR-CS GFAAS.

1. Introduction

Oily dietary supplements contain essential fatty acids, which inserted into the human diet promote beneficial effects on cardiovascular diseases, reducing blood levels of triacylglycerols, blood pressure and the inflammatory process, avoiding platelet aggregation. In addition, they are good sources of energy, act as biological regulators, offer essential compounds for the synthesis of cellular structures and play an active role in the transport of fat-soluble vitamins (A, E, D and K) (Corazza and Tarley, 2016; Carneiro et al., 2020). Among the oily dietary supplements, safflower oil, omega 3 and 6, flaxseed, sesame oil, fish oil, borage oil and sunflower oil stand out, in addition to pure vitamin E.

Different factors may contribute to the presence of trace elements in oily dietary supplements, as the raw materials used in the formulations

may have a certain load of inorganic contamination, in addition to the production process itself or even inadequate storage of the packaging and the final product (Manjusha et al., 2019; Vareda et al., 2019). The lack of quality control in production and failures in the sanitary control of commercialization are the determining factors for these products being contaminated when they reach the consumer. Contamination of food supplements is not predictable and occurs cumulatively throughout the production and handling process until consumption.

The amount in which some elements are present in these pharmaceutical products should be monitored, as daily intake even at low concentrations can cause deleterious effects on the consumer. Heavy metals such as Pb and Cd can cause adverse health effects on the lungs and functions of the cardiovascular and reproductive system (Tinkov et al., 2018; Yao et al., 2018; Charkiewicz et al., 2020; Ozzeybek et al., 2020).

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: gabicamera.leal@gmail.com (G.C. Leal).

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104651>

Received 8 March 2022; Received in revised form 9 May 2022; Accepted 22 May 2022

Available online 26 May 2022

0889-1575/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO

Título: *Suplementos alimentares oleosos: uma revisão sobre a contaminação com metais pesados*. Autores: Gabriela Camera Leal, Carine Viana. Submetido na revista *Revista de Saúde Pública*, em 2023.