

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

Franciele Rovasi Adolfo

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FERRO E NÍQUEL EM  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR HR-CS SS-GF AAS**

Santa Maria, RS  
2019

**Franciele Rovasi Adolfo**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FERRO E NÍQUEL EM SUPLEMENTOS  
ALIMENTARES POR HR-CS SS-GF AAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Santa Maria, RS  
2019

Adolfo, Franciele Rovasi  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FERRO E NÍQUEL EM  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR HR-CS SS-GF AAS / Franciele  
Rovasi Adolfo.- 2019.  
107 p.; 30 cm

Orientador: Paulo Cícero do Nascimento  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

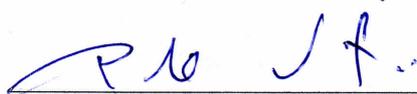
1. Absorção atômica 2. Determinação simultânea 3.  
Amostragem sólida 4. Contaminantes 5. Suplementos  
alimentares I. do Nascimento, Paulo Cícero II. Título.

**Franciele Rovasi Adolfo**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FERRO E NÍQUEL EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR HR-CS SS-GF AAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

**Aprovado em 26 de fevereiro de 2019:**



---

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



---

**Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)**



---

**Morgana Bazzan Dessuy, Dra. (UFRGS)**

Santa Maria, RS  
2019

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Tania e Francisco, que nunca mediram esforços para que este sonho se tornasse realidade. Dedico também aos meus sobrinhos, Lauren, Thaiany e Lucas, os amores da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

- À Deus, por tudo;
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento, por todo conhecimento compartilhado, confiança, paciência e constante orientação ao longo do caminho. Agradeço também pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis, que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.
- Aos meus pais, por todo apoio, dedicação e incentivo durante toda a minha vida. Pela criação e educação que me deram, por serem meus maiores exemplos das virtudes que hoje possuo.
- Ao meu companheiro, Lucas Maxwell, por compartilhar a vida e os sonhos comigo, por alegrar meus dias e me ajudar a ser uma pessoa melhor.
- Ao meu irmão de coração, Marlos Fontana, pela amizade, companheirismo e parceria durante todos esses anos.
- Aos colegas de laboratório, em especial aos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“The littlest thing can cause a ripple  
effect that changes your life...”*

*Ted Mosby  
(How I met your mother)*

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FERRO E NÍQUEL EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR HR-CS SS-GF AAS

AUTORA: Franciele Rovasi Adolfo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Neste trabalho foi desenvolvido um método para a determinação simultânea de Fe e Ni como contaminantes em suplementos alimentares por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite e amostragem direta de sólidos (HR-CS SS-GF AAS). As medidas foram feitas utilizando as linhas secundárias de Ni e Fe em 352.454 nm e 352.604 nm, respectivamente, para evitar interferências espectrais. A absorvância selecionada do volume de pico (PVSA), obtida a partir da soma dos valores de absorvância integrada do pixel central mais quatro pixels adjacentes ( $CP_{\pm 2}$ ) foi usada como sinal analítico para quantificação dos elementos. As melhores temperaturas de pirólise e atomização para Fe e Ni foram 1000 e 2700 °C, respectivamente. O uso de modificadores químicos não foi necessário e nenhum efeito de matriz foi observado. As amostras foram consideradas suficientemente homogêneas, uma vez que o fator de homogeneidade calculado foi inferior a 10. O intervalo de massa utilizado variou de 0,25 a 2,8 mg dependendo do tipo de amostra. Para comparar as medidas realizadas com diferentes massas de amostra, a PVSA foi normalizada para uma massa de amostra de 1 mg. As curvas de calibração para ambos os analitos foram obtidas simultaneamente, utilizando soluções padrões aquosas e pela técnica de adição do analito, para comparação de ambos os modos de calibração. Os limites de detecção foram 514 ng g<sup>-1</sup> para Fe e 11 ng g<sup>-1</sup> para Ni. A precisão variou de 1,33 a 5,57% e de 4,31 a 9,21% para Fe e Ni, respectivamente. A exatidão do método foi avaliada com experimentos de recuperação e comparação estatística entre as concentrações dos analitos, que foram obtidas por meio da análise das amostras sólidas com o método proposto e após a digestão das amostras. As recuperações variaram de 91,2 a 106,3 % para Fe e 75,9 a 111,7 % para Ni quando as amostras foram fortificadas com 5, 7,5 e 10 ng de Fe e 50, 75 e 100 pg de Ni e medidas pelo método proposto. A metodologia proposta foi aplicada com sucesso para determinar ambos os metais em diferentes suplementos alimentares.

**Palavras-chave:** Determinação Simultânea. Amostragem Sólida. Suplementos Alimentares. Contaminação. Ferro. Níquel. HR-CS SS-GF AAS.

## ABSTRACT

### SIMULTANEOUS DETERMINATION OF IRON AND NICKEL IN DIETARY SUPPLEMENTS BY HR-CS SS-GF AAS

AUTHOR: Franciele Rovasi Adolfo  
ADVISOR: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

In this work a method was developed for the simultaneous determination of Fe and Ni as contaminants in dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis (HR-CS SS-GF AAS). Measurements were done with the secondary lines of Ni and Fe at 352.454 nm and 352.604 nm, respectively, to avoid spectral interferences. The peak volume selected absorbance (PVSA), obtained from the sum of the integrated absorbance values of the center pixel plus the four adjacent ones ( $CP \pm 2$ ) was used as an analytical signal for the quantification of the elements. The best temperatures for pyrolysis and atomization for Fe and Ni were 1000 and 2700 °C, respectively. The use of chemical modifiers was not necessary and no matrix effects were observed. The samples were considered sufficiently homogeneous, since the calculated homogeneity factor was less than 10. Sample mass ranged from 0.25 to 2.8 mg depending on the type of the sample. To compare the measurements performed with different sample masses, the PVSA was normalized for a sample mass of 1 mg. Calibration curves for both analytes were obtained simultaneously, using aqueous standard solutions and standard addition method, for comparison for both calibration modes. The limit of detection was 514 ng g<sup>-1</sup> for Fe and 11 ng g<sup>-1</sup> for Ni. The precision ranged from 1.33 to 5.57% and from 4.31 to 9.21% for Fe and Ni, respectively. The method accuracy was assessed with recovery experiments and statistical comparison between the analytes concentrations, which were obtained by measurement solid samples with the proposed method and after digestion of the samples. The recoveries ranged from 91.2 to 106.3% for Fe and 75.9 to 111.7% for Ni when the samples were fortified with 5, 7.5 and 10 ng of Fe and 50, 75 and 100 pg of Ni and measured by the proposed method. The proposed methodology was successfully applied to determine both metals in different dietary supplements.

**Keywords:** Simultaneous Determination. Solid Sampling. Dietary Supplements. Contamination. Iron. Nickel. HR-CS SS-GF AAS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica dos flavonóides (A), unidade flavan-3-ol (B), estrutura de um tanino condensado (C). .....	22
Figura 2 - Complexos de Fe(III) com catecol em diferentes faixas de pH.....	23
Figura 3 - Estrutura química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina).....	24
Figura 4 - Estrutura do complexo Fe-cafeína. ....	24
Figura 5 - Representação esquemática do HR-CS AAS com monocromador DEMON. (1) lâmpada de arco curto de xenônio, (2) espelhos elipsoidais, (3) atomizador, (4) fenda de entrada do monocromador, (5) espelhos parabólicos, (6) prisma em configuração Littrow, (7) espelhos de deflexão e fenda intermediária variável, (8) rede Echelle e (9) detector CCD.....	31
Figura 6 - Espectro tridimensional na região espectral em $232,003 \pm 0,135$ nm para as amostras GUA-01 (m= 0,267 mg) (a) e SVM-01 (m= 1,850 mg) (b), $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C.....	50
Figura 7 - Absorvância integrada em função do comprimento de onda para 400 pg de Ni e 40 ng de Fe em solução (A) e para a amostra SVM-01 (m= 1,535 mg) (B) em 352,454 nm para Ni e 352,604 nm para Fe, $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C. ....	51
Figura 8 - Dependência do sinal de absorvância integrada para Fe (A) e Ni (B) com diferentes massas da amostra SVM-01 introduzidas no forno de grafite, $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C. ....	52
Figura 9 - Sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe (A) e Ni (B) com a utilização de diferentes massas da amostra SVM-01, $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C.....	52
Figura 10 - Dependência do sinal de absorvância integrada para Fe (A) e Ni (B) com diferentes massas da amostra GUA-01 introduzidas no forno de grafite, $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C. ....	53
Figura 11 - Sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe (a) e Ni (b) com a utilização de diferentes massas da amostra GUA-01, $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C.....	54
Figura 12 - Dependência do sinal de absorvância integrada para Fe (A) e Ni (B) com diferentes massas da amostra TERMO-01 introduzidas no forno de grafite, $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C. ....	55
Figura 13 - Sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe (A) e Ni (B) com a utilização de diferentes massas da amostra TERMO-01, $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C. ....	55
Figura 14 - Espectro resolvido no tempo obtido por HR-CS SS-GF AAS na região espectral em $352,454 \pm 0,2$ nm para a amostra TERMO-01 (m = 5,341 mg), $T_p= 1100$ °C e $T_a= 2500$ °C. ....	56
Figura 15 - Curva de pirólise obtida para Fe (A) e Ni (B) em solução padrão contendo 400pg de Ni e 40ng de Fe (—) e para as amostras TERMO-01 (—), GUA-01 (—) e SVM-01 (—) (n = 3), $T_a= 2500$ °C.....	58
Figura 16 - Variação do sinal de fundo para as amostras SVM-01 (—), GUA-01 (—) e TERMO-01 (—) com a aplicação de diferentes temperaturas de pirólise (n = 3).60	
Figura 17 - Perda de massa relativa para as amostras SVM-01 (—), GUA-01 (—) e TERMO-01 (—) durante a etapa de pirólise com a aplicação de diferentes temperaturas (n = 3).....	61

Figura 18 - Curva de atomização obtida para Fe (a) e Ni (b) em solução padrão contendo 400pg de Ni e 40ng de Fe (—) e para as amostras TERMO-01 (—), GUA-01 (—) e SVM-01 (—) (n = 3), $T_p= 1000\text{ }^\circ\text{C}$ . .....	63
Figura 19 - Sobreposição dos sinais transientes de Fe no pixel central para solução padrão (A) e para as amostras GUA-01 (B), SVM-01 (C) e TERMO-01 (D), $T_p= 1000\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_a= 2400\text{ }^\circ\text{C}$ (—), $2500\text{ }^\circ\text{C}$ (—), $2600\text{ }^\circ\text{C}$ (—) e $2700\text{ }^\circ\text{C}$ (—). .....	64
Figura 20 - Sobreposição dos sinais transientes de Ni no pixel central para as amostras SVM-01 (A), TERMO-01 (B) e GUA-01 (C) e para solução padrão (D), $T_p= 1000\text{ }^\circ\text{C}$ , $T_a= 2400\text{ }^\circ\text{C}$ (—), $2500\text{ }^\circ\text{C}$ (—), $2600\text{ }^\circ\text{C}$ (—) e $2700\text{ }^\circ\text{C}$ (—). .....	65
Figura 21 - Espectro resolvido no tempo obtido por HR-CS SS-GF AAS na região espectral em $352,454 \pm 0,2\text{ nm}$ para 400 pg de Ni e 40 ng de Fe em solução padrão (A) e para as amostras SVM-01 (m = 1,535 mg) (B), GUA-01 (m = 0,272 mg) (C) e TERMO-01 (m = 0,370 mg) (D), $T_p= 1000\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_a= 2700\text{ }^\circ\text{C}$ . .....	67
Figura 22 - Sobreposição dos sinais transientes de Fe (A) e Ni (B) no pixel central para as amostras SVM-01 (—), GUA-01 (—) e TERMO-01 (—) e para solução padrão (—), $T_p= 1000\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_a = 2700\text{ }^\circ\text{C}$ . .....	68
Figura 23 - Resultados para o teste de recuperação (A) e desvio padrão relativo (B) para determinação de Fe e Ni na amostra SVM-01 por HR-CS GF-AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (A) e $\text{HNO}_3/\text{HCl}$ (B). .....	70
Figura 24 - Intervalos de confiança (95%) para a diferença entre as médias da concentração de Fe determinada por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (A), $\text{HNO}_3/\text{HCl}$ (B), $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$ (C) e $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (D). .....	73
Figura 25 - Resultados para o teste de recuperação (A) e desvio padrão relativo (B) para determinação de Fe e Ni na amostra GUA-01 por HR-CS GF-AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (A) e $\text{HNO}_3/\text{HCl}$ (B), $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$ (C) e $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (D). .....	74
Figura 26 - Perfil segmentado das linhas de absorção obtidas para 400 pg de Ni e 40 ng de Fe em solução em $352,454\text{ nm}$ para Ni e $352,604\text{ nm}$ para Fe. .....	79
Figura 27 - Curvas de calibração obtidas para Fe em $352,604\text{ nm}$ (A) e Ni em $352,454\text{ nm}$ (B), utilizando $\text{CP}\pm 1$ (—) e $\text{CP}\pm 2$ (—), $T_p = 1000\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_a = 2700\text{ }^\circ\text{C}$ (n=3). .....	80
Figura 28 - Gráfico do perfil dos resíduos das regressões para Fe utilizando $\text{CP}\pm 1$ (A) e $\text{CP}\pm 2$ (B) e para Ni utilizando $\text{CP}\pm 1$ (C) e $\text{CP}\pm 2$ (D). .....	81
Figura 29 - Curvas de calibração obtidas pela técnica de adição do analito para Fe (A) e Ni (B) na amostra GUA-01. Os círculos preenchidos representam os dados experimentais na superfície plana ajustada para Fe ( $R^2 = 0,9943$ ) e Ni ( $R^2 = 0,9834$ ). .....	85
Figura 30 - Análise de regressão de Fe (A) e Ni (B) determinados em amostras de suplementos alimentares por HR-CS SS-GF AAS e após a digestão das amostras por via úmida (n = 3). .....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constantes de formação para os complexos de Fe e Ni com catecol e catequina.	23
Tabela 2 - Programa de temperatura para a determinação simultânea de Fe e Ni em suplementos alimentares por HR-CS SS-GF AAS.	42
Tabela 3 - Descrição das amostras de acordo com as informações relatadas nos rótulos.	43
Tabela 4 - Fator de homogeneidade calculado ( $H_c$ ) para as amostras representativas SVM-01, GUA-01 e TERMO-01 ( $n = 5$ ).	57
Tabela 5 - Concentrações de Fe e Ni na amostra SVM-01 determinadas por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas $HNO_3/H_2O_2$ (A) e $HNO_3/HCl$ (B). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ).	69
Tabela 6 - ANOVA para os valores de concentração de Fe e Ni na amostra SVM-01.	69
Tabela 7 - Concentrações de Fe e Ni na amostra GUA-01 determinadas por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas $HNO_3/H_2O_2$ (A), $HNO_3/HCl$ (B), $HNO_3/HCl/H_2O_2$ (C) e $HNO_3/H_2SO_4/H_2O_2$ (D). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ).	71
Tabela 8 - ANOVA para os valores de concentração de Fe e Ni na amostra GUA-01.	72
Tabela 9 - Resultados para o teste de comparação múltipla de Tukey.	72
Tabela 10 - Concentrações de Fe e Ni na amostra TERMO-01 determinadas por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas $HNO_3/H_2O_2$ (A), $HNO_3/HCl$ (B), $HNO_3/HCl/H_2O_2$ (C) e $HNO_3/H_2SO_4/H_2O_2$ (D). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ).	76
Tabela 11 - ANOVA para os valores de concentração de Fe e Ni na amostra TERMO-01.	77
Tabela 12 - Resultados para o teste de comparação múltipla de Tukey.	77
Tabela 13 - Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente às curvas de calibração para Fe e Ni.	82
Tabela 14 - Figuras de mérito para a determinação simultânea de Fe e Ni por HR-CS SS-GF AAS.	83
Tabela 15 - Inclinações das curvas de calibração para Fe e Ni nas amostras SVM-01, GUA-01 e TERMO-01 obtidas pela técnica de adição do analito.	85
Tabela 16 - Desvio padrão relativo para a determinação simultânea de Fe e Ni por HR-CS SS-GF AAS ( $n = 3$ ).	86
Tabela 17 - Resultados obtidos para os testes de adição e recuperação de Fe e Ni nas amostras SVM-01, GUA-01 e TERMO-01, após adição de 5, 7,5 e 10 ng de Fe e 50, 75 e 100 pg de Ni em solução. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ).	87
Tabela 18 - Resultados obtidos para a determinação simultânea de Fe e Ni em amostras de suplementos alimentares por HR-CS GF AAS com amostragem sólida e após a digestão das amostras. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ).	88

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	16
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	SUPLEMENTOS ALIMENTARES .....	17
2.1.1	<b>Suplementos vitamínicos minerais</b> .....	19
2.1.2	<b>Termogênicos à base de cafeína</b> .....	20
2.1.3	<b>Guaraná</b> .....	20
2.1.3.1	<i>Atividade quelante dos polifenóis e cafeína</i> .....	21
2.2	CONTAMINANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	25
2.2.1	<b>Ferro</b> .....	26
2.2.2	<b>Níquel</b> .....	28
2.3	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA (AAS) .....	29
2.4	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS AAS).....	30
2.4.1	<b>Instrumentação</b> .....	30
2.4.2	<b>Determinação simultânea multielementar</b> .....	32
2.5	ANÁLISE DIRETA DE AMOSTRAS SÓLIDAS .....	35
2.5.1	<b>Calibração na análise direta de amostras sólidas</b> .....	37
2.5.2	<b>Influência da massa de amostra</b> .....	39
2.5.3	<b>Homogeneidade e erros de amostragem</b> .....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
3.1	INSTRUMENTAÇÃO .....	40
3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	42
3.3	AMOSTRAS .....	42
3.4	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FINS COMPARATIVOS .....	44
3.5	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
3.5.1	<b>Curva de calibração e linearidade</b> .....	46
3.5.2	<b>Limite de detecção e limite de quantificação</b> .....	47
3.5.3	<b>Precisão</b> .....	47
3.5.4	<b>Exatidão</b> .....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
4.1	ESCOLHA DOS COMPRIMENTOS DE ONDA .....	48
4.2	INFLUÊNCIA DA MASSA DE AMOSTRA.....	51

4.3	HOMOGENEIDADE .....	56
4.4	OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO .....	57
4.5	INTERFERÊNCIAS ESPECTRAIS .....	66
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ .....	67
4.7	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FINS COMPARATIVOS .....	69
4.8	CALIBRAÇÃO E FIGURAS DE MÉRITO .....	78
4.9	PRECISÃO E EXATIDÃO .....	85
4.10	APLICAÇÃO ANALÍTICA .....	88
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Suplementos alimentares são produtos de ingestão oral, apresentados em formas farmacêuticas, que visam complementar a dieta normal de indivíduos saudáveis. Estes produtos podem conter vitaminas, minerais, plantas, extratos de plantas, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados (BRASIL, 2018c). A facilidade de comercialização dos suplementos aliada ao forte apelo publicitário estimula a população ao consumo indiscriminado desses produtos. Lamentavelmente, muitos consumidores têm informações limitadas e, muitas vezes, presumem que o uso de suplementos alimentares é inofensivo sem avaliar os possíveis riscos à saúde (FRENTIU et al., 2012; KORFALI; HAWI; MROUEH, 2013; SMICHOWSKI; LONDONIO, 2018). Preocupações globais sobre a segurança e a qualidade dos suplementos são desencadeadas por regulamentação limitada, adulterações e potenciais contaminações durante a fabricação e armazenamento (UDOUSORO; IKEM; AKINBO, 2017).

Os suplementos alimentares podem ser considerados uma potencial fonte de contaminação por metais (MARRERO et al., 2013). A presença de impurezas inorgânicas em produtos farmacêuticos normalmente está associada à existência destes elementos na matéria-prima e/ou ao próprio processo de produção, incluindo catalisadores metálicos, reagentes, solventes, equipamentos utilizados na fabricação, embalagens, entre outros (BALARAM, 2016; BARIN et al., 2016; DE PAULA et al., 2012; KRAWCZYK, 2014). Deste modo, a determinação quantitativa de contaminantes em suplementos alimentares é de extrema importância para garantir a qualidade e segurança destes produtos, visto que elementos tóxicos ou potencialmente tóxicos representam um fator de risco à saúde dos consumidores (MARRERO et al., 2013).

Neste âmbito, diferentes técnicas analíticas, tais como a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) (FILIPIAK-SZOK et al., 2015; FILIPIAK-SZOK; KURZAWA; SZŁYK, 2014; KORFALI; HAWI; MROUEH, 2013; SOŁTYK et al., 2003; UDOUSORO; IKEM; AKINBO, 2017), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) (JURCA et al., 2001; KREJČOVÁ et al., 2006; MARRERO et al., 2013; UDOUSORO; IKEM; AKINBO, 2017), espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) (CANFRANC et al., 2001; SORIANO et al., 2007a; SORIANO et al., 2007b), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS,

do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) (KORFALI; HAWI; MROUEH, 2013; SOŁTYK et al, 2003; TUMIR et al., 2010) e a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS, do inglês *High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*) (KRAWCZYK, 2014), têm sido usadas em conjunto com diferentes estratégias para a preparação de amostras na determinação de minerais e contaminantes em suplementos alimentares.

Em geral, estes produtos encontram-se na forma sólida e são convertidos em soluções aquosas por meio de procedimentos clássicos de tratamento de amostra, como procedimentos por via úmida. Entretanto, esses procedimentos apresentam limitações que dependem do tipo de amostra, dos analitos e de suas concentrações, onde os erros sistemáticos mais frequentes são a perda dos analitos por volatilização e o risco de contaminação, podendo afetar diretamente a exatidão dos resultados analíticos. Além disso, a etapa de preparação requer tempo, o que pode ser considerado uma desvantagem, principalmente quando há um grande número de amostras a serem analisadas (NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008; VALE; OLESZCZUK; DOS SANTOS, 2006).

Deste modo, o uso de uma metodologia baseada na análise direta de amostras sólidas (SS, do inglês *solid sampling*) pode ser considerado uma alternativa eficiente aos métodos convencionais de preparo de amostras, capaz de fornecer resultados confiáveis e de forma rápida (GÓMEZ-NIETO et al., 2013; RESANO et al., 2013; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006). Neste contexto, a HR-CS AAS empregada em conjunto com a SS é especialmente útil na análise direta de amostras complexas devido ao seu eficiente sistema de correção de fundo. A capacidade multielementar da técnica ainda que limitada somada a todas as vantagens apresentadas da SS tornam a HR-CS SS-GF AAS uma técnica de extrema importância para resolução de inúmeros desafios analíticos, principalmente em aplicações que requerem a análise de dois ou mais elementos em amostras de difícil decomposição.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um método rápido e simples para a determinação simultânea de Fe e Ni em amostras de suplementos alimentares empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização eletrotérmica em forno de grafite com amostragem sólida.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Escolher os comprimentos de onda mais adequados para a determinação simultânea de Fe e Ni;
- Estudar a influência da massa de amostra introduzida no atomizador e avaliar a homogeneidade das amostras;
- Desenvolver e otimizar um programa de temperatura adequado à determinação dos elementos de interesse;
- Investigar a possibilidade de realizar a quantificação utilizando calibração contra padrões aquosos;
- Avaliar diferentes procedimentos de digestão e determinar qual o mais adequado para cada tipo de amostra;
- Aplicar o método proposto em amostras de suplementos alimentares;
- Comparar estatisticamente os resultados obtidos por amostragem sólida com os obtidos após a digestão das amostras.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A revisão bibliográfica está dividida em cinco itens principais. Inicialmente, serão abordados os aspectos gerais sobre suplementos alimentares, com ênfase em suplementos vitamínicos minerais, guaraná e termogênicos à base de cafeína, que consistem nas amostras analisadas neste trabalho. No segundo item será apresentada uma revisão a respeito de contaminantes em suplementos alimentares, com destaque para ferro e níquel. Posteriormente, será abordado o princípio da espectrometria de absorção atômica e os principais aspectos teóricos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, incluindo a instrumentação e a possibilidade da determinação simultânea multielementar. Por fim, será discutida a técnica de análise direta de amostras sólidas, com destaque para calibração, influência da massa de amostra e homogeneidade.

### **2.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Indivíduos de certos grupos populacionais com maior risco de deficiência de nutrientes, tais como aqueles que seguem dietas restritas ou pertencem a determinados estágios de vida em particular, como idosos, mulheres grávidas e lactantes, podem alcançar as necessidades nutricionais através da suplementação (O'CONNELL, 2001; MARRA; BOYAR, 2009).

Em geral, suplementos alimentares são produtos de ingestão oral, apresentados em formas farmacêuticas, que visam complementar a dieta com nutrientes ou outras substâncias específicas (BRASIL, 2016). Contudo, vários tipos de suplementos são comercializados com indicação para diversas finalidades, como aumentar o desempenho físico, ganho de massa muscular, definição corporal, redução de gordura corpórea, melhora da resistência e recuperação pós-exercício, além de outras atribuições como prevenção de doenças e retardo dos efeitos adversos do envelhecimento (FONTENELE, LUNA, 2013). O forte apelo publicitário aliado a diversidade de alegações, faz com que esses produtos sejam amplamente consumidos mundialmente (ABE-MATSUMOTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015; CARVALHO; ARAÚJO, 2008).

De acordo com o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), programa que avalia o estado nutricional de adultos e crianças nos Estados Unidos, 40% da população americana consumia um ou mais suplementos alimentares durante 1988 e 1994. Entre o período de 2003 e 2006, esse número passou a ser superior a 50%, sendo os vitamínicos minerais o tipo de suplemento mais comum em todas as pesquisas realizadas pelo NHANES (GAHCHE et al., 2011; ROCK, 2007). No Brasil, alguns estudos realizados, apesar de restritos a determinados grupos populacionais, mostram que o consumo de suplementos chega a ser comparável ao encontrado nos Estados Unidos (ABE-MATSUMOTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015).

O *Food and Drug Administration* (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, regula os suplementos alimentares sob a Lei de Saúde e Educação sobre Suplementos Dietéticos (DSHEA, do inglês *Dietary Supplement Health and Education Act*) de 1994. A DSHEA classifica os suplementos alimentares em uma categoria do gênero alimentício e não como medicamento, tendo como principal foco a rotulagem e comercialização destes produtos, ao invés da fabricação e processamento dos mesmos (DURÃO, 2008; SONI et al., 2010). Regulamentos publicados pela FDA determinam que as empresas sejam responsáveis pela avaliação da segurança e qualidade de seus produtos, os quais devem conter apenas as substâncias rotuladas e não

quaisquer outras substâncias nocivas ou indesejáveis, incluindo metais pesados (AVULA et al., 2011; SONI et al., 2010).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dos suplementos alimentares é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que nos últimos anos vem aumentando a sua atuação através de determinações legais, visando à qualidade e a segurança desses produtos (FONTENELE, LUNA, 2013). Os suplementos alimentares, apesar de serem uma das categorias de produtos que mais tiveram crescimento do consumo no país, não possuíam uma definição jurídica precisa acerca de sua natureza ou tratamento regulatório específico pelas entidades competentes (CARVALHO; ARAÚJO, 2008). Os produtos definidos como suplementos alimentares pelo FDA eram subdivididos em diferentes categorias (ABE-MATSUMOTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015), como suplementos vitamínicos e/ou minerais, alimentos para atletas, novos alimentos e substâncias bioativas com alegações de propriedade funcional.

Nesse sentido, com o intuito de regular a comercialização e reduzir a assimetria de informações existentes a respeito dos suplementos alimentares, esses produtos passaram a contar com uma regulamentação específica. Em 2018, foi publicada a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA nº 243/2018, que dispõe sobre os requisitos sanitários gerais destes produtos, incluindo regras de composição, qualidade, segurança e rotulagem (BRASIL, 2018c). Em paralelo, também foi publicada a Instrução Normativa (IN) nº 28/2018 que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares (BRASIL, 2018a). Junto com essas normas, a Agência também publicou a RDC nº 239/2018, a qual estabelece os aditivos e coadjuvantes de tecnologia permitidos para estes produtos (BRASIL, 2018b).

### **2.1.1 Suplementos vitamínicos minerais**

Suplementos vitamínicos minerais são produtos que visam complementar com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável em casos em que a ingestão a partir da alimentação seja insuficiente (ABE-MATSUMOTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015). A IN nº 28/2018 estabelece a lista de constituintes bem como os limites mínimos e máximos de cada nutriente que devem ser fornecidos e não devem ser ultrapassados pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo de acordo com o grupo populacional indicado pelo fabricante (BRASIL, 2018a).

### 2.1.2 Termogênicos à base de cafeína

A cafeína é considerada a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo e está presente na natureza em mais de 60 espécies vegetais (TFOUNI et al., 2007). Esta substância é encontrada em sementes de café, folhas de chá verde, cacau, guaraná e erva-mate. Estas espécies são muito consumidas na forma de bebidas, as quais constituem a principal fonte de cafeína na dieta (GURLEY; STEELMAN; THOMAS, 2014; HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010). Adicionalmente, vários medicamentos e suplementos alimentares, como emagrecedores, diuréticos, estimulantes e analgésicos, também contribuem para a sua ingestão (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010; TFOUNI et al., 2007).

Os efeitos da cafeína sobre a saúde e desempenho humano têm sido objeto de estudos há algumas décadas. Esses efeitos podem ser descritos como aumento da capacidade de alerta e atenção, melhora do humor, redução da fadiga, ação lipolítica e melhora do desempenho físico de atletas (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010; MELLO; KUNZLER; FARAH, 2007). Os efeitos com o uso da cafeína podem ser notados com doses entre 3-6 mg/kg (ALVES; LIMA, 2009). Em geral, os suplementos de cafeína oferecem 200 mg de cafeína por porção, sendo permitido uma recomendação diária de 400 mg exclusivo para atletas (Brasil, 2018a). No entanto, quando ingerida em doses elevadas, a cafeína pode provocar insônia, ansiedade, tremores, cefaleia, irritação gastrointestinal e hemorragia (ALVES; LIMA, 2009; HIGGINS; TUTTLE; HIGGINS, 2010).

### 2.1.3 Guaraná

O guaraná, *Paullinia cupana* Kunth, é uma planta da família Sapindaceae, originária da região Amazônica. É amplamente utilizado na medicina tradicional brasileira e conhecido mundialmente por suas propriedades estimulantes e gastronômicas (SOUSA et al., 2010; SOUSA et al., 2011). Na medicina popular, é utilizado como estimulante das funções cerebrais, indicado nos casos de esgotamento, depressão nervosa e no combate à enxaqueca, além de afrodisíaco, antitérmico e analgésico (KUSKOSKI et al., 2005; SILVEIRA; BURIAN; AMORIM, 2018). Aproximadamente 70% da produção de guaraná é direcionada para a indústria de refrigerantes e bebidas energéticas na forma de xarope, enquanto o restante é utilizado como guaraná em pó para a fabricação de outros produtos, incluindo suplementos alimentares (DA SILVA et al., 2017; SANTOS et al., 2017; SCHIMPL et al., 2013).

As sementes são a parte comercialmente útil da planta devido ao seu alto teor de cafeína (até 6% do peso seco), à qual a propriedade estimulante do guaraná é atribuída (DA SILVA et al., 2017). A quantidade de cafeína no guaraná é cerca de 2 a 5 vezes maior do que a encontrada nas sementes de café (SCHIMPL et al., 2013) e pode variar de acordo com a região de plantio, método de cultivo, presença de contaminantes químicos e métodos de secagem (MIRANDA; METZNER, 2010; TFOUNI et al., 2007).

Além da cafeína, as sementes também são caracterizadas pela presença de amido, teofilina, teobromina, polifenóis, fósforo, potássio, ferro, cálcio, tiamina, vitamina A, proteína, açúcares e fibras (DA SILVA et al., 2017; MIRANDA; METZNER, 2010; SCHIMPL et al., 2013; SOUSA et al., 2010; SOUSA et al., 2011).

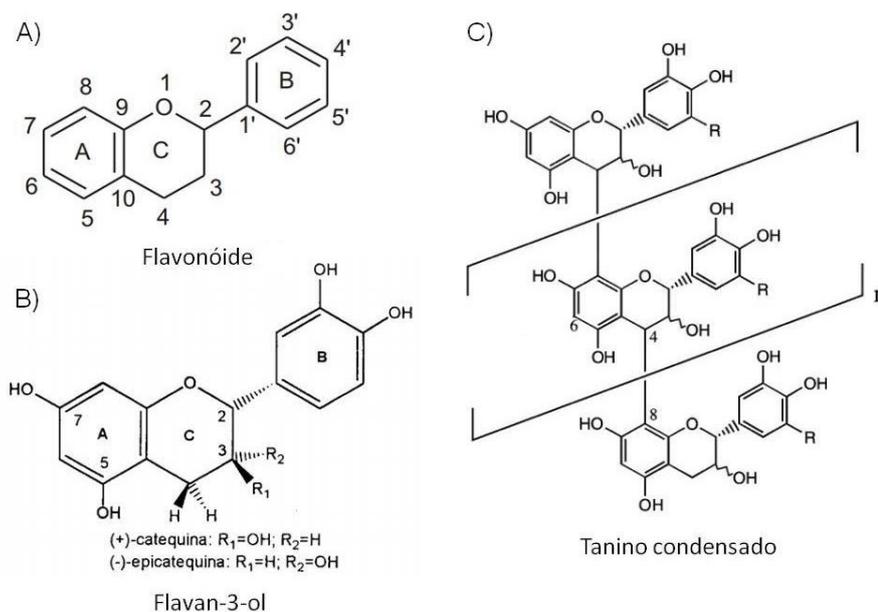
Os extratos de guaraná demonstram atividade antioxidante, antiviral, bactericida e de inibição de algumas enzimas extracelulares, atribuído à presença de compostos fenólicos (BITTENCOURT et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; PERRON; BRUMAGHIM, 2009; SOUSA et al., 2011).

#### *2.1.3.1 Atividade quelante dos polifenóis e cafeína*

Os polifenóis possuem pelo menos um anel aromático ao qual está ligada uma ou mais hidroxilas e, de acordo com as suas características estruturais, podem ser divididos em vários subgrupos. No entanto, aqueles comumente encontrados em alimentos vegetais podem ser categorizados em três subgrupos principais: ácidos fenólicos, flavonóides e não flavonóides (ZHANG; TSAO, 2016).

Os flavonóides apresentam como estrutura química básica o núcleo flavânico, formado por dois anéis aromáticos (A, B) ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (C) (Fig. 1A). As diferentes substituições na estrutura química básica promovem a divisão destes compostos em diferentes subclasses (FRAGA et al., 2010; MANACH et al., 2004; ZHANG; TSAO, 2016). A catequina e epicatequina, principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de guaraná, pertencem à subclasse denominada de flavanóis (flavan-3-óis) (BITTENCOURT et al., 2016). Estes compostos são constituídos por um anel floroglucinol (A), um anel pirânico (C) e um anel catecol (B) (Fig. 1B). Os taninos condensados são formados a partir da condensação de duas ou mais unidades monoméricas de catequinas e epicatequinas (Fig. 1C) (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; MANACH et al., 2004).

Figura 1 - Estrutura básica dos flavonóides (A), unidade flavan-3-ol (B), estrutura de um tanino condensado (C).



Fonte: adaptado de SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001.

A estrutura 3',4'-dihidroxifenil do anel B (catecol) dos flavanóis permite a complexação de determinados íons de metais de transição (KHOKHAR; APENTEN, 2003). Quando desprotonado, o ligante catecolato possui átomos de oxigênio doadores de alta densidade eletrônica e, por este motivo, comporta-se como uma base de Lewis dura. Deste modo, a interação com cátions de alta densidade de carga é favorecida (ácidos de Lewis duros), como  $\text{Fe}^{3+}$  (HIDER; LIU; KHODR, 2001; PERRON; BRUMAGHIM, 2009). Apesar dos valores de  $\text{pK}_a$  na faixa de 7 a 9 para o grupo OH mais ácido, os polifenóis são facilmente desprotonados na presença de ferro em pH mais baixo e formam complexos muito estáveis (ELHABIRI et al., 2007; HIDER; LIU; KHODR, 2001; PERRON; BRUMAGHIM, 2009). Em particular, complexos de  $\text{Fe(III)}$  com catecol têm constantes de estabilidade extremamente grandes quando três grupos catecolatos estão ligados a um centro de ferro (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; PERRON et al., 2010). A Tabela 1 mostra as constantes de formação para os complexos de Fe e Ni com polifenóis, além do valor de  $\text{pM}$ , o qual pode ser usado para descrever a afinidade dos ligantes pelos íons metálicos (ATHAVALE; PRABHU; VARTAK, 1966; ELHABIRI et al., 2007; PERRON; BRUMAGHIM, 2009; TEMPLETON, 2002).

Tabela 1 - Constantes de formação para os complexos de Fe e Ni com catecol e catequina.

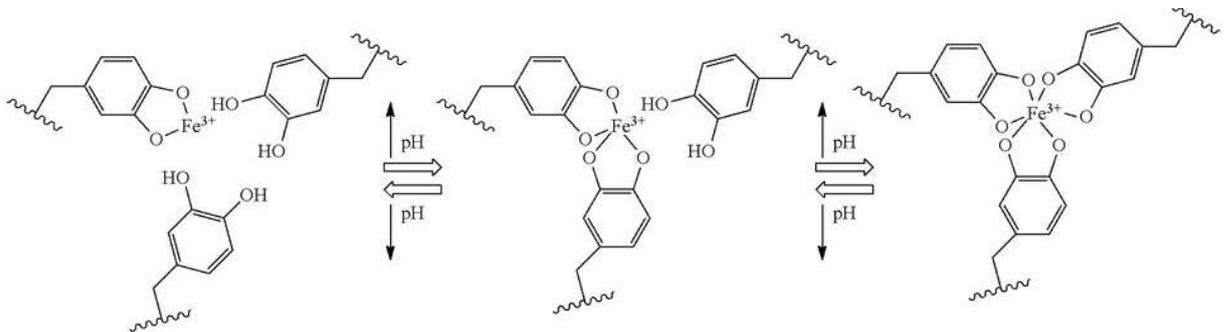
Ligante	Íon	Log $k_1$	Log $k_2$	Log $k_3$	Log $\beta$	pM*
Catecol	Fe <sup>2+</sup>	7,95	5,55	-	13,50	6,00
	Fe <sup>3+</sup>	20,01	14,69	9,06	43,76	15,5
	Ni <sup>2+</sup>	8,36	5,15	-	13,51	-
Catequina	Fe <sup>3+</sup>	21,8	15,7	9,9	47,4	17,20

\* pM =  $-\log [M]$ , calculado para força iônica de 0,1 M, 25 °C, pH neutro e  $[M] = 10^{-6}$  M.

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam que para polifenóis, como o catecol e catequina, é provável que nenhum ferro férrico livre significativo permaneça em equilíbrio em solução. Por outro lado, Fe<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup> são ácidos de Lewis moderados e não se ligam fortemente com o catecol (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; PERRON et al., 2010).

Os complexos formados dependem do pH e, frequentemente, exibem modos de coordenação variáveis, isto é, o catecol pode formar mono, bis ou tris-complexos com Fe<sup>3+</sup>, como mostra a Figura 2 (ELHABIRI et al., 2007; HIDER; LIU; KHODR, 2001; PERRON; BRUMAGHIM, 2009). Adicionalmente, os polifenóis que possuem mais de um sítio de ligação são capazes de polimerização.

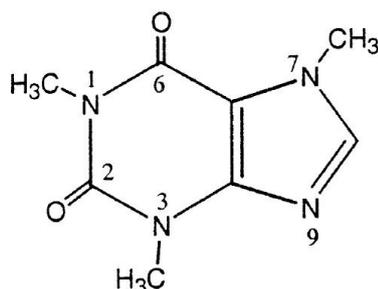
Figura 2 - Complexos de Fe(III) com catecol em diferentes faixas de pH.



Fonte: LEE; HOLTEN-ANDERSEN; WAITE, 2013.

A cafeína (Fig. 3), estruturalmente identificada como 1,3,7-trimetilxantina, é um pseudoalcalóide pertencente ao grupo das metilxantinas (SIMÕES et al., 2010). Supõe-se que esta substância é capaz de se ligar a certos íons metálicos e alterar seu equilíbrio no corpo humano. Alguns estudos relatam que as pessoas que consomem grandes quantidades de cafeína tendem a ter um risco maior de desenvolver problemas ósseos, incluindo osteoporose, bem como problemas nos processos de absorção, excreção e reabsorção de metais (KOLAYLI et al. 2004), incluindo o ferro (JABBAR; KABIR; CHOWDHURY, 2012).

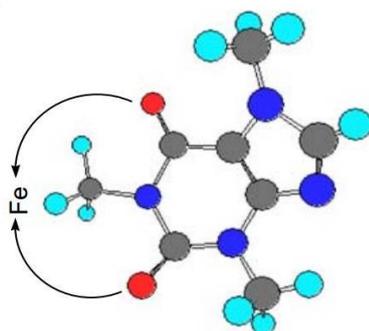
Figura 3 - Estrutura química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina).



Fonte: KOLAYLI et al. 2004.

As interações entre cafeína e íons metálicos podem ocorrer através de seus átomos doadores, oxigênio e nitrogênio (KOLAYLI et al. 2004; MEYER; NOCKEMANN, 2003). Porém, como os átomos N1, N3 e N7 estão bloqueados para coordenação devido à ligação com grupos metila, as interações entre a cafeína e íons metálicos provavelmente ocorrem através dos átomos O2, O6 (JABBAR; KABIR; CHOWDHURY, 2012; KOLAYLI et al. 2004; SOUZA) e N9 (MEYER; NOCKEMANN, 2003). Jabbar, Kabir e Chowdhury (2012) avaliaram a influência da cafeína no comportamento redox do ferro em solução aquosa. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que há uma forte interação entre Fe e os átomos de oxigênio O2 e O6 da cafeína, havendo a formação de um complexo muito estável na proporção 1:1, como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Estrutura do complexo Fe-cafeína.



Fonte: JABBAR; KABIR; CHOWDHURY, 2012.

Bittencourt e colaboradores (2016) demonstraram que o extrato de guaraná (contendo polifenóis e cafeína) é capaz de quelar eficientemente o Fe em todas as concentrações testadas pelos autores. No mesmo estudo, a cafeína purificada também demonstrou capacidade como um quelante de ferro, embora não tão eficiente quanto os extratos de guaraná. Kolayli e

colaboradores (2004) realizaram um estudo cujo objetivo era encontrar a extensão da interação de íons metálicos com a cafeína em solução aquosa. Os autores relataram que todos os íons investigados, dentre eles o  $\text{Fe}^{2+}$ , formaram complexos com a cafeína. No entanto, em comparação ao EDTA, os complexos formados foram considerados relativamente fracos. Por outro lado, estudos relacionados à eficiência de extração de metais de amostras de café para infusões associaram a baixa capacidade de extração de Fe à formação de complexos fortes deste elemento com a cafeína e outros alcalóides (ASHU; CHANDRAVANSI, 2011; POHL et al., 2013; STELMACH; POHL; SZYMCZYCHA-MADEJA, 2013).

Lima e colaboradores (2010) avaliaram amostras de café verde e torrado em relação à capacidade de complexação de  $\text{Fe}^{2+}$ . As amostras avaliadas apresentaram poder quelante dose-dependente e foi constatado influência da descafeinação e torração do café. A diminuição dessa atividade nas amostras descafeinadas foi atribuída à diminuição de compostos com atividade quelante, como polifenóis e cafeína, durante o processo de descafeinação.

Mladěnka e colaboradores (2011) realizaram uma análise detalhada da quelação de ferro por flavonóides e, de acordo com os autores, todos os flavonóides testados formaram complexos estáveis com o Fe em pH neutro.

## 2.2 CONTAMINANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Para a população em geral, a principal via de exposição a elementos essenciais e não essenciais é a partir da dieta (MUDGAL et al., 2010). Elementos essenciais são aqueles que são requeridos por um organismo para manter sua função fisiológica normal (PRASAD, 2008). Para estes elementos essenciais, existe uma determinada faixa de ingestão sobre a qual o seu fornecimento é adequado para promover o crescimento e a manutenção da vida (GARCÍA-RICO; LEYVA-PEREZ; JARA-MARINI, 2007; SWANSON, 2003). Assim, tanto a deficiência quanto o excesso de um determinado mineral na dieta pode provocar efeitos adversos ao organismo (PRASAD, 2008). Por outro lado, os elementos não essenciais são aqueles que não apresentam funções definidas no metabolismo humano e podem gerar sérios danos à saúde (GOYER, 1997).

Deste modo, monitorar o teor dos elementos presentes na dieta é de importância crítica para a saúde humana, tanto para orientar a ingestão satisfatória e evitar a exposição excessiva aos minerais quanto para prevenir efeitos adversos à saúde devido à presença de contaminantes (MUDGAL et al., 2010). Neste âmbito, a contribuição dos suplementos

alimentares para a ingestão de micronutrientes e elementos tóxicos tem sido extensivamente estudada, visto que estes produtos são amplamente consumidos mundialmente. Diversas agências reguladoras destacaram que alguns suplementos alimentares podem induzir problemas de saúde com relação à sua qualidade, eficácia e segurança para o consumo humano. O fraco controle de qualidade aumenta o risco de contaminação desses produtos por bactérias, fungos, metais pesados e metalóides (KORFALI; HAWI; MROUEH, 2013). No que diz respeito aos metais, os suplementos alimentares podem conter elementos essenciais e não essenciais em diferentes faixas de concentração, sejam eles adicionados intencionalmente como ingredientes ou provenientes de contaminação (SMICHOWSKI; LONDONIO, 2018).

### 2.2.1 Ferro

O Fe é um micronutriente essencial para os seres humanos devido às importantes funções que desempenha nos processos celulares, participando como cofator de proteínas ou enzimas envolvidas na síntese de biomoléculas, transporte de oxigênio e metabolismo energético (ANDERSON; MCLAREN, 2012; GALARIS; PANTOPOULOS, 2008; LIEU et al., 2001). Este mineral é obtido principalmente a partir de fontes alimentares, tanto na forma heme, de origem animal, quanto na forma não-heme (ferro inorgânico), de origem vegetal (MESÍAS; SEIQUER; NAVARRO, 2013; RAJPATHAK et al., 2009). Além do Fe naturalmente presente nos alimentos, muitos produtos industrializados são enriquecidos com Fe a fim de combater a anemia proveniente da carência deste mineral e, em paralelo, muitas pessoas consomem suplementos alimentares contendo Fe (SWANSON, 2003; ZIMMERMANN; HURRELL, 2007).

Segundo as Ingestões Dietéticas de Referência (DRIs, do inglês *Dietary Reference Intakes*) elaboradas pelo comitê do *Food and Nutrition Board/Institute of Medicine* (FNB/IOM), a Ingestão Dietética Recomendada (RDA, do inglês *Recommended Dietary Allowance*) de ferro para homens e mulheres adultos é de 8 e 18 mg/dia, respectivamente. O Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL, do inglês *Tolerable Upper Intake Level*) de ferro é de 45 mg/dia, com base em distúrbios gastrintestinais que podem ocorrer com doses maiores (IOM, 2001).

O conteúdo de ferro corporal em uma pessoa depende do peso, sexo, capacidade de armazenamento de Fe, entre outros fatores (MESÍAS; SEIQUER; NAVARRO, 2013). Um indivíduo adulto tem em seu organismo cerca de 3 a 5 g de Fe total (GROTTO, 2008;

VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005), presente como Fe funcional, armazenado ou transportado (MESÍAS; SEIQUER; NAVARRO, 2013; PUNTARULO, 2005).

As funções biológicas do Fe baseiam-se nas suas propriedades químicas (LIEU et al., 2001). Este elemento pode existir em diferentes estados de oxidação nos sistemas biológicos, como férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (LIEU et al., 2001; RAJPATHAK et al., 2009). A interconversão dos estados de oxidação do Fe é um mecanismo pelo qual este elemento age como um catalisador nas reações de oxidação-redução, participa da transferência de elétrons e liga-se reversivelmente a diferentes ligantes (MESÍAS; SEIQUER; NAVARRO, 2013). No entanto, esta característica também é responsável pela toxicidade observada em condições em que o Fe está em excesso (SWANSON, 2003).

Em condições normais, o balanço do ferro é determinado pela taxa de absorção, que é regulada de modo a evitar o acúmulo no organismo e pelas perdas fisiológicas, uma vez que não existe um mecanismo ativo de excreção de ferro (MESÍAS; SEIQUER; NAVARRO, 2013; PRÁ et al. 2012). Qualquer alteração desse equilíbrio pode acarretar na deficiência ou excesso do metal (GROTTO, 2008). A sobrecarga de Fe é caracterizada pelo aumento do Fe corporal total superior a 5 g (HUANG, 2003), geralmente associada à hemocromatose hereditária, uma desordem genética relacionada ao aumento da absorção intestinal de ferro, consumo excessivo de ferro através da dieta e frequentes transfusões sanguíneas, requeridas para o tratamento de alguns tipos de anemias (BONINI-DOMINGOS, 2007; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

O efeito deletério de Fe é relacionado à sua capacidade de catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GALARIS; PANTOPOULOS, 2008; LIEU et al., 2001; PUNTARULO, 2005). As ERO, quando produzidas em excesso e não destruídas pelo sistema antioxidante de defesa do organismo (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; VASCONCELOS et al., 2007), podem reagir facilmente com quase todas as moléculas encontradas em células vivas (LIEU et al., 2001), levando ao dano oxidativo do DNA, prejudicando a síntese de proteínas, lipídios de membrana e carboidratos (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; ZHANG; TSAO, 2016).

Devido ao potencial reativo do Fe, o seu acúmulo no organismo tem sido associado ao desenvolvimento de várias condições patológicas, incluindo doenças hepáticas e cardíacas, câncer, distúrbios neurodegenerativos como Alzheimer e Parkinson, diabetes, além de anormalidades hormonais e do sistema imunológico (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

### 2.2.2 Níquel

O níquel é considerado um micronutriente essencial para alguns animais, microorganismos e plantas (CEMPEL; NIKEL, 2006; KAMERUD; HOBBIE; ANDERSON, 2013; PEETERS et al., 2017), atuando como cofator ou componente de algumas metaloenzimas (SPIEWAK; PIETOWSKA; CURZYTEK, 2007; WITTSIEPE et al., 2009; ZAMBELLI; UVERSKY; CIURLI, 2016). Embora não tenham sido encontradas enzimas contendo Ni em animais superiores, este íon metálico também foi classificado como um "elemento possivelmente essencial" para seres humanos no início da década de 1970 (FREITAS et al., 2013; ZAMBELLI; UVERSKY; CIURLI, 2016). Contudo, seu papel na essencialidade para os seres humanos ainda não está confirmado, uma vez que não há estudos que determinem a importância nutricional deste elemento (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002; IOM, 2001; KAMERUD; HOBBIE; ANDERSON, 2013; PEETERS et al., 2017; RICCIARDI et al., 2001). Como resultado, o Ni muitas vezes é considerado apenas pelo seu potencial tóxico (ZAMBELLI; UVERSKY; CIURLI, 2016).

O níquel é um dos muitos elementos amplamente distribuídos no meio ambiente, sendo liberado tanto de fontes naturais quanto de atividade antropogênica (CEMPEL; NIKEL, 2006). Está presente no ar, na água, no solo e em alimentos tanto de origem vegetal quanto animal (CEMPEL; NIKEL, 2006; DENKHAUS; SALNIKOW, 2002; PEETERS et al., 2017). Deste modo, os seres humanos são constantemente expostos a este elemento, principalmente por inalação, ingestão e absorção dérmica (CEMPEL; NIKEL, 2006; DENKHAUS; SALNIKOW, 2002; FREITAS et al., 2013). Na população em geral, a ingestão alimentar é a via de exposição mais importante. Estima-se que a ingestão de Ni a partir da dieta varie entre 100 e 300 µg/dia (CEMPEL; NIKEL, 2006; PEETERS et al., 2017; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). Alimentos ricos em Ni incluem centeio, aveia, cacau, chocolate, chá, ervilha, brócolis, entre outros (RICCIARDI et al., 2001; ZAMBELLI; UVERSKY; CIURLI, 2016).

A exposição ao Ni através do ar, da água e dos diferentes tipos de alimentos torna difícil estabelecer sua essencialidade na dieta humana, uma vez que a deficiência deste metal não ocorre naturalmente (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002). Adicionalmente, nem uma função bioquímica foi claramente demonstrada para o níquel em humanos (IOM, 2001). Portanto, não há valores estabelecidos para a Necessidade Média Estimada (EAR, do inglês *Estimated Average Requirement*), para a Ingestão Dietética Recomendada (RDA) (IOM, 2001) e para a Ingestão Adequada (AI, do inglês *Adequate Intake*) para este elemento (IOM,

2001). No entanto, alguns estudos indicam que a necessidade deste elemento varia entre 5 e 50 µg/dia (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002; ZAMBELLI; UVERSKY; CIURLI, 2016). O Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) de níquel é de 1 mg/dia (IOM, 2001).

O contato com compostos de níquel pode ter efeitos adversos na saúde humana dependendo da via de exposição (DAS; DAS; DHUNDASI, 2010). A alergia ao níquel na forma de dermatite de contato é a reação mais comum e mais conhecida (DAS; DAS; DHUNDASI, 2010; PEETERS et al., 2017; RICCIARDI et al., 2001). Além disso, a exposição crônica ao Ni pode levar à fibrose pulmonar, doenças cardiovasculares, renais e câncer (CEMPEL; NIKEL, 2006).

Quando ingerido, entre 1 e 35% do Ni pode ser absorvido pelo trato gastrointestinal (HABER et al., 2000), dependendo da sua forma química, sendo as formas solúveis em água mais facilmente absorvidas (CEMPEL; NIKEL, 2006; DENKHAUS; SALNIKOW, 2002). A biodisponibilidade do Ni também é afetada pela maneira com a qual este elemento é consumido, podendo variar de acordo com o tipo e quantidade de alimentos presentes no estômago no momento da ingestão (CEMPEL; NIKEL, 2006; HABER et al., 2000). Após absorvido, o Ni é transportado no sangue ligado principalmente à albumina (DAS; DAS; DHUNDASI, 2010; IOM, 2001) e distribui-se por diferentes órgãos e tecidos, sendo encontrado principalmente nos rins após exposição oral (CEMPEL; NIKEL, 2006; HABER et al., 2000). Em pessoas com hipersensibilidade ao níquel, a exposição oral resulta em sintomas semelhantes aos da dermatite de contato (CEMPEL; NIKEL, 2006; IOM, 2001).

Adicionalmente, acredita-se que o níquel desempenha um papel nos processos fisiológicos como co-fator na absorção de ferro do intestino (DAS; DAS; DHUNDASI, 2008; DAS; DAS; DHUNDASI, 2010). Provavelmente, o acúmulo de ferro induzido pelo níquel pode ser diretamente responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio e o subsequente aumento da peroxidação lipídica (CEMPEL; NIKEL, 2006).

### 2.3 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA (AAS)

A espectrometria de absorção atômica (AAS) baseia-se no princípio de que átomos livres no estado gasoso são capazes de absorver radiação eletromagnética de frequência específica proveniente de uma fonte de radiação. (BORGES et al., 2005; ROBINSON; FRAME; FRAME II, 2005; WELZ; VALE, 2004). A atenuação da intensidade de radiação emitida pela fonte é proporcional à quantidade de analito presente, sendo utilizada para quantificar o analito (WELZ; SPERLING, 1999). A energia necessária para promover o

elétron de um átomo de um nível de menor energia para outro de maior energia é relacionada ao comprimento de onda ou frequência da radiação a ser absorvida pela Equação de Planck (1).

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1)$$

Onde: E é a energia necessária para a transição eletrônica no átomo; h é a constante de Planck;  $\nu$  é a frequência da onda; c é a velocidade da luz e  $\lambda$  é o comprimento de onda (WELZ; SPERLING, 1999; WELZ; VALE, 2004).

A mudança de estado requer a absorção ou emissão de energia exatamente igual à diferença de energia entre os estados inicial e final ( $\Delta E$ ). Deste modo, os átomos podem absorver ou emitir apenas as frequências específicas ou os comprimentos de onda que correspondem à diferença exata de energia entre estes dois estados. Uma vez que cada elemento químico tem seus elétrons de valência em níveis energéticos específicos, somente algumas transições eletrônicas são permitidas e essas transições definem o espectro de linhas de absorção/emissão de cada elemento (WELZ; SPERLING, 1999).

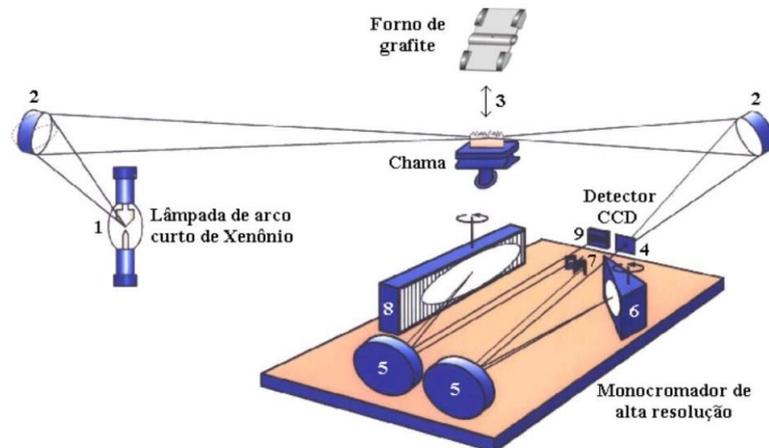
Em AAS, as transições de uso prático são quase sempre as que ocorrem entre o estado fundamental e um estado excitado, as chamadas linhas de ressonância. A transição que apresenta maior probabilidade de acontecer (absorção mais forte) é considerada a linha analítica mais sensível (linha primária) e, normalmente, ocorre entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado. As transições que ocorrem entre o estado fundamental e os demais níveis energéticos são interpretadas como linhas secundárias menos sensíveis (linhas alternativas) (WELZ; SPERLING, 1999).

## 2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS AAS)

### 2.4.1 Instrumentação

A Figura 5 apresenta um arranjo esquemático de um HR-CS AAS, com a configuração utilizada atualmente.

Figura 5 - Representação esquemática do HR-CS AAS com monocromador DEMON. (1) lâmpada de arco curto de xenônio, (2) espelhos elipsoidais, (3) atomizador, (4) fenda de entrada do monocromador, (5) espelhos parabólicos, (6) prisma em configuração Littrow, (7) espelhos de deflexão e fenda intermediária variável, (8) rede *Echelle* e (9) detector CCD.



Fonte: WELZ et al., 2005.

Uma lâmpada de arco curto de Xenônio de alta pressão (1) foi especialmente desenvolvida para fornecer elevada potência radiante especialmente na região do UV, e abrange a faixa de comprimentos de onda entre 190 e 900 nm (WELZ, 2005). A lâmpada é constituída por dois eletrodos com uma distância de 1 mm entre eles, e a pressão de Xe no interior da lâmpada é de aproximadamente 17 bar, quando fria. A lâmpada apresenta potência nominal de 300 W e, durante a sua operação em modo “*hot-spot*”, uma descarga entre os eletrodos aumenta a pressão interna da lâmpada por um fator de 3 a 4 (50 bar), gerando um micro plasma próximo à superfície do catodo com temperatura de aproximadamente 10.000 K e diâmetro menor que 0,2 mm. Com estas características, a intensidade de emissão excede a de uma lâmpada de cátodo oco em 1 a 3 ordens de grandeza, o que contribui para a obtenção de uma melhor razão sinal/ruído (S/N) (WELZ et al., 2005; WELZ et al., 2010a; WELZ et al., 2010b; WELZ; VALE, 2004).

A radiação da CS é focada através do atomizador (3) para a fenda de entrada do espectrômetro (4) usando dois espelhos elipsoidais (2) e é então dirigida ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (do inglês *Double-Echelle Monochromator*), onde incidirá em um prisma (6) que desempenha o papel de pré-dispersor, selecionando a parte do espectro de interesse. Somente a radiação pré-selecionada passa através da fenda intermediária ajustável (7), e é direcionada à rede *Echelle* (8), que fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado.

Por fim, a radiação altamente resolvida, atinge o detector (9) que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) sensível na região do UV. O detector possui 588 pixels com dimensões individuais de 24 x 24  $\mu\text{m}$ . Como cada pixel é equipado com um amplificador individual, o instrumento opera de fato com 588 detectores independentes, 200 dos quais são utilizados para propósitos analíticos. Todos os 200 pixels são iluminados e lidos simultaneamente e a intensidade de radiação é convertida em absorvância para cada pixel individualmente. Isto significa que todo o ambiente espectral a cerca de 200 pm ao redor da linha analítica na região do UV e cerca de 500 pm na região visível do espectro torna-se “visível”, permitindo uma série de informações indisponíveis em instrumentos convencionais (BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2005; WELZ et al., 2010b). Enquanto na LS AAS só a absorvância (com chama como atomizador) ou absorvância versus tempo (com atomizador eletrotérmico) é medida, o CCD empregado na HR-CS AAS acrescenta o comprimento de onda como terceira dimensão (BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2014). Deste modo, há três diferentes maneiras de visualizar os dados em HR-CS AAS, isto é, o tradicional sinal transiente (absorvância integrada versus tempo), o sinal de absorvância integrada versus comprimento de onda e o espectro tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda (BORGES et al., 2005).

O instrumento é controlado por um *software* que permite o processamento total dos dados após a leitura. Uma das principais características do *software* é a capacidade de corrigir automaticamente todos os eventos que são contínuos em relação à faixa espectral observada, ou seja, eventos que afetam de maneira similar todos os pixels do detector. Embora todos os 200 pixels utilizados para fins analíticos sejam iluminados pela mesma fonte de radiação e lidos simultaneamente, apenas alguns deles serão utilizados para medir a absorção atômica (tipicamente 3-5 pixels). Os outros pixels ou conjunto de pixels podem ser selecionados para corrigir efeitos espectrais contínuos, isto é, qualquer alteração da intensidade medida que é idêntica para todos os pixels (BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2005).

#### **2.4.2 Determinação simultânea multielementar**

Uma das principais vantagens da utilização de uma fonte de radiação contínua de alta intensidade na HR-CS AAS é que todas as linhas de absorção dos elementos na faixa espectral do espectrômetro (de 190 a 900 nm) são acessíveis e, portanto, há um grande número de linhas disponíveis para alguns elementos (RESANO et al., 2011; WELZ et al., 2005; WELZ et al., 2010a; WELZ et al., 2010b). Como a intensidade da radiação é

aproximadamente uniforme nas diversas regiões do espectro UV-Vis, não há mais linhas “fracas”, isto é, linhas com baixa intensidade de emissão. Deste modo, as linhas secundárias têm a mesma razão sinal/ruído (S/N) melhorada que a linha analítica principal, podendo ser usadas para fins analíticos sem comprometimentos. Com estas características, a utilização de uma CS abre a possibilidade para a determinação simultânea multielementar (WELZ et al., 2005 (DITBERT et al., 2019; RESANO et al., 2011; WELZ et al., 2005; WELZ et al., 2010a; WELZ et al., 2010b).

No entanto, os equipamentos disponíveis atualmente não permitem uma fácil implementação desta importante característica, pois o potencial da instrumentação é limitado (BOSCHETTI et al., 2014; RESANO et al., 2011; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014; RESANO; GARCÍA-RUIZ, 2011). O equipamento possui uma resolução excepcional uma vez que cada pixel monitora uma faixa de apenas 1 a 2 pm dependendo do comprimento de onda (quanto menor o comprimento de onda maior a resolução). Porém, isto também significa que só é possível a monitorização simultânea de apenas uma pequena porção do espectro, 0,2-0,3 nm na região do UV, aumentando para 0,5 nm na região do visível (GÓMEZ-NIETO et al., 2013; RESANO et al., 2013; RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013).

Deste modo, é necessário encontrar uma região espectral em que as linhas atômicas dos analitos estejam próximas o suficiente para serem monitoradas simultaneamente (BOSCHETTI et al., 2014; RESANO et al., 2013; RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013; WELZ et al., 2010b). No entanto, apesar de alguns elementos possuírem centenas de linhas de absorção, nem todas as linhas apresentam a mesma sensibilidade, logo a concentração esperada dos analitos também é um fator relevante na seleção do comprimento de onda. Deste modo, a razão entre a sensibilidade das linhas monitoradas deve ser compatível (na mesma ordem de grandeza) com a razão entre a concentração dos analitos nas amostras (RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013).

Adicionalmente, os procedimentos analíticos devem ser elaborados respeitando-se as características térmicas de todos os analitos, pois em alguns casos, o comportamento termoquímico dos elementos pode ser um fator limitante, quando estes se comportam de maneira distinta (AMORIM et al., 2008; RESANO; GARCÍA-RUIZ, 2011). Assim, o programa de temperatura deve ser otimizado para permitir a determinação simultânea dos analitos sem prejuízo no desempenho de um deles. Em geral, a temperatura de pirólise é escolhida com base no elemento mais volátil, pois deve ser suficientemente baixa para evitar a perda do mesmo, enquanto a temperatura de atomização está diretamente associada ao

elemento mais refratário, pois deve ser suficientemente alta para atomizar este elemento, sem que haja uma diminuição significativa na intensidade do sinal do elemento mais volátil (CORREIA; NOMURA; OLIVEIRA, 2003; POZZATTI et al., 2017; RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013).

A primeira aplicação envolvendo a determinação simultânea por HR-CS GF AAS foi feita através do monitoramento da linha de ressonância principal do Cd (228,802 nm) e a linha secundária do Fe (228,726 nm) em amostras de grãos. Neste trabalho, os autores utilizaram duas temperaturas de atomização distintas para a atomização seletiva dos analitos, com o mesmo programa de temperatura (DOS SANTOS et al., 2009). Desde então, a HR-CS AAS têm sido utilizada com sucesso na determinação simultânea de dois ou mais elementos em diferentes tipos de amostras, como Mo e Ni em amostras de vinho e sedimentos (BOSCHETTI et al., 2014), Cr e Fe em amostras de óleo cru (DITTERT et al., 2009), Co e Ni em amostras de vitamina B12 (ADOLFO et al., 2016), Cu e Fe em amostras de farinha (DOS SANTOS et al., 2017), Cd, Fe e Sn em amostras de alimentos enlatados (LEAO et al., 2016), entre outros.

Na literatura foram encontrados relativamente poucos trabalhos referentes à determinação simultânea de Fe e Ni por HR-CS AAS. Gómez-Nieto e colaboradores (2013) realizaram a determinação direta e simultânea destes elementos em amostras biológicas sólidas, utilizando a linha de ressonância primária de Ni em 232,003 nm e a linha secundária de Fe em 232,036 nm. Neste caso, as curvas de pirólise obtidas para ambos os analitos foram similares e uma temperatura de 1200 °C foi escolhida, não sendo necessário o uso de modificadores químicos para prevenir a perda dos analitos. Os maiores valores de absorvância integrada para Fe foram obtidos em temperaturas de atomização entre 2000 e 2500 °C, enquanto que para Ni foi observado um acentuado aumento nos valores de absorvância de 2000 a 2600 °C, obtendo-se valores similares em temperaturas superiores. Deste modo, como temperatura de compromisso para ambos os analitos, os autores utilizaram uma temperatura de atomização de 2600 °C.

Estas mesmas linhas de absorção de Fe e Ni também foram utilizadas para a determinação destes elementos em amostras de fluoropolímeros (SOARES et al., 2016) e amostras de vegetais (POZZATTI et al., 2017). No primeiro estudo, as temperaturas de pirólise e atomização foram 800 e 2300 °C, respectivamente. Em temperaturas de pirólise superiores a 800 °C foi observado um decréscimo nos valores de absorvância integrada para ambos os elementos nas amostras sólidas devido à volatilização dos analitos nas formas de seus respectivos fluoretos. Por este motivo, um gás adicional na etapa de pirólise foi utilizado

como modificador químico ( $H_2$ ;  $0,5 \text{ L min}^{-1}$ ). Este efeito não foi observado para os analitos em solução, evidenciando o efeito da matriz na volatilidade dos elementos (SOARES et al., 2016). No segundo estudo, as temperaturas de pirólise e atomização foram  $1400$  e  $2500 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Neste caso, não foi necessário o uso de modificadores químicos (POZZATTI et al., 2017).

Alguns trabalhos encontrados na literatura também descrevem a determinação simultânea de Fe, Ni e outros elementos por HR-CS AAS. Resano et al. (2011) realizaram a determinação simultânea de Fe ( $352,604$  e  $352,617 \text{ nm}$ ), Ni ( $352,404 \text{ nm}$ ) e Co ( $352,685 \text{ nm}$ ), em material de referência certificado de tecido de ostra. Valdivia et al. (2018) desenvolveram uma estratégia analítica para a determinação simultânea de Fe ( $294,2357 \text{ nm}$ ), Ni ( $294,3912 \text{ nm}$ ) e V ( $294,2357 \text{ nm}$ ) em amostras de cinzas de combustível. Resano et al. (2013) desenvolveram um método para a determinação simultânea de Co, Fe, Ni e Pb em amostras de nanotubos de carbono, monitorando a região entre  $283,168$  e  $283,481 \text{ nm}$ .

## 2.5 ANÁLISE DIRETA DE AMOSTRAS SÓLIDAS

O uso de uma metodologia baseada na análise direta de amostras sólidas (SS) pode ser considerado uma alternativa eficiente aos métodos convencionais de preparo de amostra, capaz de fornecer resultados confiáveis e de forma rápida (GÓMEZ-NIETO et al., 2013; RESANO et al., 2013; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006). Esta estratégia analítica é simples e apresenta vantagens, tais como (BELARRA et al., 2002; NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014; RESANO; VANHAECKE; DE LOOS-VOLLEBREGT, 2008; WELZ et al., 2007b):

- Menores riscos de contaminação devido ao uso reduzido de reagentes, pouca manipulação ou menor exposição ao ambiente;
- Minimização da perda dos analitos;
- Maior sensibilidade, uma vez que não há a diluição da amostra;
- Maior velocidade de análise;
- Possibilidade de análise de pequenas quantidades de amostra;
- Uso de reagentes corrosivos e perigosos é eliminado, resultando em menor periculosidade além de benefícios econômicos e ambientais.

A GF AAS apresenta características que a tornam uma técnica adequada para a análise direta de sólidos, como a alta sensibilidade e seletividade, boa detectabilidade e facilidade na introdução da amostra no atomizador (GÓMEZ-NIETO et al., 2013; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006; NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008). Adicionalmente, a utilização de um programa de aquecimento permite o pré-tratamento térmico da amostra e facilita a separação do analito da matriz, possibilitando a calibração do equipamento com soluções aquosas (RESANO et al., 2004; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014).

Contudo, apesar das características favoráveis da SS-GF AAS, esta técnica apresenta algumas limitações, tais como (BELARRA et al., 2002; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006; WELZ et al., 2007a; WELZ et al., 2007b):

- Baixa precisão devido à heterogeneidade natural das amostras, resultando em desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) elevado se comparada à análise de soluções;
- Procedimento de calibração complexo, uma vez que pode ser necessário o uso de materiais de referência certificados de composição similar às amostras a serem analisadas;
- Presença de quantidade elevada de matriz no atomizador acarreta em elevado fundo e possibilidade de interferência espectral;
- Limitada a amostras que apresentem baixa concentração do analito devido à alta sensibilidade e dificuldade de diluir as amostras.

Porém, a precisão obtida depende do número de repetições realizadas e o desvio padrão relativo raramente excede valores de 10% a 15%, sendo que valores de até 20% são considerados aceitáveis em muitas situações reais, particularmente em análise de traços (BELARRA et al., 2002; RESANO; VANHAECKE; DE LOOS-VOLLEBREGT, 2008). Deste modo, a precisão relativamente baixa não deve ser considerada uma grande limitação da técnica (VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006).

A necessidade de materiais de referência certificados sólidos com composição similar às amostras a serem analisadas deve-se a possibilidade da matriz da amostra influenciar no sinal analítico, ou seja, causar interferências. No entanto, a aplicação do conceito STPF (do inglês, *Stabilized Temperature Platform Furnace*) permitiu minimizar grande parte das

interferências não espectrais durante o processo de atomização do analito (WELZ et al., 2007a; WELZ et al., 2007b).

No entanto, embora a LS GF AAS com a correção de fundo apropriada e o controle adequado do processo de atomização e vaporização do analito possa resolver alguns problemas relacionados à análise SS, o uso de uma fonte de linha convencional ainda apresenta limitações para este propósito. O problema é tipicamente associado a interferências espectrais causadas pela matriz da amostra e que não podem ser corrigidas corretamente pelos sistemas de correção disponíveis para LS (GÓMEZ-NIETO et al., 2013; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006; WELZ et al., 2007b).

Por outro lado, o uso de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua permite a correção automática e simultânea de todos os eventos contínuos (WELZ et al., 2007a; WELZ et al., 2007b; WELZ et al., 2014). Outra vantagem apresentada é que toda a região espectral na vizinhança da linha analítica torna-se visível à alta resolução, possibilitando a detecção de interferências espectrais não contínuas causadas pela absorção da radiação por contaminantes ou absorção de fundo por moléculas de estrutura fina (BORGES et al., 2005; GÓMEZ-NIETO et al., 2013; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006). A absorção de fundo pode ser corrigida através da subtração de um espectro de referência do espectro da amostra usando um algoritmo de mínimos quadrados para correção de fundo. Como resultado, apenas os sinais atômicos dos analitos permanecem visíveis (ARAUJO et al., 2009; BORGES et al., 2005; BOSCHETTI et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, soluções aquosas já eram utilizadas com sucesso para a construção de curvas de calibração mesmo para utilização de uma LS. Essa tendência é ainda maior para HR-CS AAS, uma vez que esta técnica apresenta desempenho superior em termos de detecção e correção de efeitos da matriz (RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014; WELZ et al., 2007b).

### **2.5.1 Calibração na análise direta de amostras sólidas**

Diferentes técnicas de calibração podem ser empregadas para análise direta de sólidos por AAS com atomização eletrotérmica, como a calibração usando material de referência certificado (CRM) sólido, a técnica de adição do analito e a calibração com padrões aquosos (BERGLUND; BAXTER, 1992; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006). Devido à facilidade de aplicação e o custo relativamente baixo, a calibração com soluções padrões é preferida em relação às demais. Contudo, quando a matriz da amostra influencia

significativamente o sinal analítico, ou seja, causa interferência não espectral, recomenda-se que a calibração seja feita com CRM sólido cuja composição seja similar às amostras a serem analisadas. Na prática, além de aumentar o custo da análise, a aplicação desta técnica é restrita, uma vez que nem sempre há a disponibilidade de CRM adequado para o tipo de amostra a ser analisada (BERGLUND; BAXTER, 1992; KURFÜRST, 1998; NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008).

Felizmente, grande parte das interferências não espectrais durante o processo de atomização eletrotérmica do analito podem ser minimizadas através da otimização adequada do programa de aquecimento, possibilitando, em muitos casos, que a calibração seja feita a partir da utilização de padrões aquosos (NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008; WELZ et al., 2007a; WELZ et al., 2007b).

Virgilio e colaboradores (2012) avaliaram a viabilidade da calibração com padrões aquosos para determinação de Cr em plantas usando amostragem sólida através da comparação entre as inclinações das curvas de calibração usando padrões aquosos e massas crescentes de CRM. Do mesmo modo, durante o desenvolvimento de um método para determinação simultânea de Fe e Ni em amostras biológicas, Gómez-Nieto e colaboradores (2013) também realizaram um estudo comparativo entre as técnicas de calibração. Em ambos os casos, não foram observadas diferenças significativas entre as inclinações das curvas, indicando a possibilidade de utilizar soluções padrões para a calibração.

Borges e colaboradores (2006) desenvolveram um método para determinação direta de Pb em amostras biológicas. Para demonstrar que os padrões aquosos podem ser aplicados com segurança, a calibração foi realizada usando padrões aquosos e um CRM sólido. Neste caso, não foram observadas diferenças significativas entre as duas técnicas de calibração em relação aos valores determinados, quando comparados aos valores certificados a um nível de confiança de 95%.

De forma similar, a calibração contra padrões aquosos têm sido comparada com a técnica de adição do analito (KRAWCZYK, 2014). Nesta técnica, a solução padrão é adicionada sobre a massa de amostra previamente pesada na plataforma para a amostragem sólida (COŞKUN; AKMAN, 2004). Contudo, esta abordagem é mais complexa que as demais devido à impossibilidade de manter a massa de amostra constante. Como consequência, concentrações variáveis dos analitos em solução padrão são adicionadas à massas de amostras variáveis. Neste caso, a resposta (absorvância) será uma função de duas variáveis independentes, obtendo-se uma curva de calibração tridimensional (BERGLUND; BAXTER, 1992; COŞKUN; AKMAN, 2004; VALE; OLESZCZUK; SANTOS, 2006).

Outra prática comum encontrada na literatura é a comparação estatística dos resultados obtidos por amostragem sólida com os obtidos por diferentes procedimentos de decomposição. Resano e colaboradores (2013) determinaram simultaneamente Fe, Ni, Co e Pb em nanotubos de carbono usando amostragem sólida. Para fins de validação, uma das amostras analisadas também foi digerida e, neste caso, uma boa concordância com os resultados pela análise da solução resultante do procedimento de digestão foi obtida, com intervalos de incerteza sobrepostos em todos os casos, confirmando a possibilidade de utilizar soluções padrões para calibração.

Coşkun e Akman (2004) realizaram a determinação de Mn em suplemento vitamínico mineral por SS-ET AAS usando calibração com CRM sólido, calibração contra padrões aquosos e pela técnica de adição do analito. A fim de comparar os resultados obtidos pelos diferentes métodos de calibração, a amostra também foi digerida e analisada. De acordo com os autores, após a otimização dos parâmetros experimentais, foi observada boa concordância entre os resultados obtidos por amostragem sólida e os obtidos pela digestão da amostra, demonstrando que as três técnicas de calibração avaliadas foram adequadas para determinação de Mn neste tipo de amostra.

Uma maneira alternativa de avaliar a possibilidade de utilizar soluções padrões para a calibração é através da comparação dos perfis dos sinais analíticos e os valores das áreas dos picos obtidos para as amostras sólidas aos obtidos para padrões aquosos (BELARRA et al., 2003; GÓMEZ-NIETO et al., 2013; RESANO et al., 2004; RESANO et al., 2011; RESANO et al., 2013; SOARES et al. 2016).

Em geral, estes estudos demonstram que soluções padrões podem ser utilizadas com sucesso para a calibração na análise direta de diferentes tipos de amostras após a otimização das condições analíticas, permitindo uma determinação livre de interferências.

### **2.5.2 Influência da massa de amostra**

A amostragem direta de sólidos permite o uso de massas diminutas de amostra para fazer a análise. Todavia, a utilização de massas muito pequenas pode comprometer a representatividade da amostra devido à heterogeneidade natural da mesma (GÓMEZ-NIETO et al., 2013; NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008). Por outro lado, resultados inexatos também podem ser obtidos quando massas maiores de amostra são utilizadas. Diversos estudos relatam sobre uma massa de amostra máxima que pode ser usada na análise por SS GF AAS. Acima dessa massa crítica, a absorvância não aumenta linearmente com o aumento

da massa de amostra devido à remoção ineficiente da matriz na etapa de pirólise. Como consequência, a liberação do analito da matriz pode ser prejudicada, dificultando a vaporização do mesmo e ainda causar um aumento do sinal de fundo (DA SILVA et al., 2005; GÓMEZ-NIETO et al., 2013; NOMURA; SILVA; OLIVEIRA, 2008; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014; VIRGILIO et al., 2012).

Deste modo, resultados precisos só podem ser obtidos com a utilização de um determinado intervalo de massa que varia de acordo com os diferentes analitos e matrizes (BELARRA et al., 1997).

### 2.5.3 Homogeneidade e erros de amostragem

As informações relativas aos erros de amostragem, por consequência da baixa homogeneidade de uma pequena massa de amostra, podem ser estabelecidas através da constante de Homogeneidade ( $H_e$ ), proposta por Kurfürst, conforme a Equação 2.

$$H_e = S_H \times m^{1/2} \quad (2)$$

A incerteza da amostragem  $S_H$  de uma determinada massa de amostra  $m$  (geralmente 1 mg) pode ser estimada a partir dos valores do desvio padrão relativo (RSD) das medidas, considerando as incertezas do procedimento analítico. Quando o fator de homogeneidade for menor que 10 ( $H_e < 10$ ), o material pode ser considerado suficientemente homogêneo (KURFÜRST, 1998).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todos os experimentos foram realizados usando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) equipado com atomizador de forno de grafite e amostrador sólido automático modelo SSA 600. O sistema óptico do equipamento consiste em uma lâmpada de arco curto de xenônio operando em modo *hot-spot* como fonte de radiação, um monocromador de alta resolução (*Double-Echelle Monochromator*) e detector constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD), que permite visualizar e avaliar todo o ambiente

espectral a cerca de 0,2 – 0,3 nm em ambos os lados da linha analítica na região do UV, aumentando para 0,5 nm na região do visível.

As linhas secundárias de Ni e Fe em 352,454 nm e 352,604 nm, respectivamente, foram utilizadas para a determinação simultânea destes elementos. A resolução espectral para ambas as linhas é de aproximadamente 2,0 pm por pixel e o intervalo espectral alcançado pelo detector nesta linha analítica de Ni corresponde a cerca de  $\pm 0,2$  nm em torno de 352,454 nm. As medidas foram feitas usando o pixel central (CP) mais quatro pixels adjacentes ( $CP \pm 2$ ) para Fe ( $164 \pm 2$ ) e Ni ( $89 \pm 2$ ). A absorvância selecionada do volume de pico,  $A_{\Sigma,int}$ , (PVSA, do inglês *peak volume selected absorbance*), ou seja, a absorvância integrada ( $A_{int}$ ) de 5 pixels para Fe e Ni foi usada para avaliação do sinal analítico e quantificação dos elementos.

Todas as medidas foram realizadas usando o modo de correção “fundo com referência”, no qual é possível obter tanto os valores da absorvância integrada corrigida quanto os valores da absorção de fundo.

As amostras foram pesadas em plataforma de grafite para amostragem sólida (SS), previamente tarada, usando uma microbalança integrada ao amostrador com precisão de 1  $\mu$ g, e automaticamente inseridas no forno de grafite de SS, sem orifício de dosagem. Todas as operações foram controladas por um sistema computacional exceto a deposição da amostra na plataforma, que foi realizada manualmente e cuja massa variou entre 0,25 e 2,8 mg dependendo do tipo de amostra. Para comparar as medidas realizadas com diferentes massas de amostra, a PVSA foi normalizada para 1 mg de amostra.

Para as medidas realizadas com padrão aquoso, foi pipetado automaticamente um volume de 20  $\mu$ L na plataforma de amostragem sólida. Todas as medidas foram realizadas no mínimo em triplicatas. Os parâmetros experimentais otimizados para a HR-CS SS-GF AAS são apresentados na Tabela 2.

Para os experimentos com propósito comparativo as amostras foram digeridas e as soluções resultantes posteriormente foram analisadas utilizando o mesmo equipamento no qual o amostrador sólido foi substituído pelo amostrador líquido MPE 60. Neste caso, foi utilizado forno de grafite com plataforma PIN integrada e volume de amostra de 40  $\mu$ L. De forma similar, as linhas secundárias de Ni e Fe em 352,454 nm e 352,604 nm, respectivamente, foram utilizadas para a determinação simultânea destes elementos, usando os mesmos parâmetros instrumentais descritos para a amostragem sólida.

Tabela 2 - Programa de temperatura para a determinação simultânea de Fe e Ni em suplementos alimentares por HR-CS SS-GF AAS.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Rampa (°C s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo de permanência (s)</b>	<b>Vazão do argônio (L min<sup>-1</sup>)</b>
Secagem	120	5	10	2
Pirólise	1000	150	10	2
Auto-zero	1000	0	10	2
Atomização	2700	1200	10	0
Limpeza	2720	500	4	2

### 3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

A solução estoque (10 mL) contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de Fe e 1 mg L<sup>-1</sup> de Ni, foi preparada a partir de soluções padrões disponíveis comercialmente de 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada um dos elementos (SpecSol, Quimlab, São Paulo, Brasil) e acidificada com 50 µL de ácido nítrico 65% v/v (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) bidestilado em destilador de ácidos (Distillacid, Bergrof BSB 939-IR, Eningen, Alemanha). As soluções de calibração foram preparadas diariamente a partir de diluições adequadas da solução estoque com água purificada (Milli-Q system - Millipore, Bedford, MA, USA) com resistividade de 18,2 MΩcm.

### 3.3 AMOSTRAS

Três tipos diferentes de suplementos alimentares disponíveis comercialmente na forma de cápsulas ou comprimidos foram analisados. As amostras foram identificadas de acordo com a sua composição pelos seguintes códigos: SVM (01 a 07) para suplementos vitamínicos minerais, GUA (01 a 05) para os quais contém guaraná em sua composição e TERMO (01 a 03) para termogênicos a base de cafeína. A Tabela 3 mostra uma descrição detalhada da composição dos suplementos alimentares analisados de acordo com as informações relatadas pelo fabricante nos rótulos. As amostras SVM-01, GUA-01 e TERMO-01 foram usadas como amostras representativas para o desenvolvimento e otimização do método.

Para análise por HR-CS SS-GF AAS, as amostras na forma de comprimidos foram moídas manualmente utilizando almofariz e pistilo de ágata até homogeneização e posteriormente foram peneiradas em peneira de plástico. As amostras na forma de cápsulas foram abertas e o conteúdo posteriormente analisado sem nenhum tratamento prévio.

Tabela 3 - Descrição das amostras de acordo com as informações relatadas nos rótulos.

<b>Amostra</b>	<b>Ingredientes declarados</b>
SVM-01; SVM-02	Óxido de magnésio, ácido ascórbico, vitamina E, niacina, óxido de zinco, betacaroteno, pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, colesterciferol, sulfato de cobre, piridoxina, D-biotina, riboflavina, fitonadiona, mononitrato de tiamina, selenito de sódio, ácido fólico, cianocobalamina, cloreto de cromo, molibdato de sódio, celulose microcristalina e dióxido de silício.
SVM-03	Bitartarato de colina, bisglicinato de magnésio, vitamina C, niacina, piridoxina, ácido fólico, picolinato de cromo, aroma natural de laranja amarga, excipiente silicato de magnésio e dióxido de silício.
SVM-04	Sulfato de zinco, selenato de sódio, cloridrato de piridoxina, picolinato de cromo, biotina, estabilizante croscarmelose, lactose e dióxido de silício.
SVM-05	Nicotinamida, óxido de zinco, cloridrato de piridoxina, sulfato de cobre anidro, selenito de sódio, biotina, celulose microcristalina, colágeno hidrolisado, estearato de magnésio vegetal e dióxido de silício.
SVM-06	Fosfato dibásico de cálcio, citrato de colina, sulfato de zinco, óxido de magnésio, selênio, picolinato de cromo, ácido fólico, vitaminas B1, B6, B12, C e E, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, dióxido de silício e revestimento (agente de corpo etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, triacetina, dióxido de titânio e corantes artificiais vermelho Bordeaux, vermelho 40 e azul 2).
SVM-07	Acetato de vitamina A, cloridrato de tiamina, cianocobalamina, cloridrato de piridoxina, ácido ascórbico, colesterciferol, sorbitol, dióxido de silício, edulcorante sucralose, aroma de lima-limão, corantes artificiais azul indigotina e amarelo tartrazina
GUA-01	Guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> )
GUA-02	Guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> )
GUA-3	Guaraná em pó e dióxido de silício
GUA-04	Guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) e açáí ( <i>Euterpe oleracea</i> )
GUA-05	Guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ), amido, carbonato de cálcio, goma arábica, polivinilpirrolidona e estearato de magnésio
TERMO-01	Suplemento de cafeína para atletas
TERMO-02	Cafeína anidra, farinha de arroz, dióxido de silício
TERMO-03	Cafeína

### 3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FINS COMPARATIVOS

Para avaliar os resultados obtidos, as amostras foram digeridas e as soluções resultantes posteriormente foram analisadas por HR-CS GF AAS. Deste modo, após a homogeneização adequada das amostras, os seguintes procedimentos de digestão foram avaliados:

- A) Aproximadamente 0,5 g da amostra SVM-01 e 0,2 g das amostras GUA-01 e TERMO-01 foram pesados e transferidos para tubos de vidro, previamente descontaminados. Em seguida, foram adicionados 3 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado à amostra SVM-01 e 2 mL às amostras GUA-01 e TERMO-01. Posteriormente, os tubos foram aquecidos em bloco digestor a aproximadamente 100 °C. Após 24 horas, os frascos foram retirados do aquecimento e, ainda á quente, foram adicionados 1,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à amostra SVM-01 e 1 mL às amostras GUA-01 e TERMO-01. As soluções resultantes foram filtradas e diluídas com água purificada a um volume adequado (20 mL para a amostra SVM-01 e 15 mL para as amostras GUA-01 e TERMO-01).
- B) Aproximadamente 0,5 g da amostra SVM-01 e 0,2 g das amostras GUA-01 e TERMO-01 foram pesados e transferidos para tubos de vidro. As amostras foram tratadas com uma mistura de 3 mL de  $\text{HNO}_3$  e 2 mL de  $\text{HCl}$  e aquecidas em bloco digestor a 100 °C por 24 horas. Após o resfriamento, as soluções resultantes foram filtradas e diluídas com água purificada a um volume adequado (20 mL para a amostra SVM-01 e 15 mL para as amostras GUA-01 e TERMO-01).
- C) 1,5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado foram adicionas às amostras GUA-01 e TERMO-01 (aproximadamente 0,2 g). As amostras foram aquecidas em bloco digestor a 100 °C por 2 horas. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de  $\text{HCl}$  e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , prosseguindo o aquecimento até completar 12 horas. Após o resfriamento, as soluções resultantes foram filtradas e transferidas para frascos volumétricos de 15 mL.
- D) Aproximadamente 0,2 g das amostras GUA-01 e TERMO-01 foram tratadas com uma mistura de 2 mL de  $\text{HNO}_3$  e 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e aquecidas em bloco digestor a 100 °C. Após 24 horas, as amostras foram retiradas do aquecimento e, ainda á quente, foram adicionados 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As soluções resultantes foram filtradas e diluídas com água purificada a 15 mL.

A eficiência dos procedimentos foi avaliada através do ensaio de recuperação para Fe e Ni que consistiu na adição de 2 µg de Fe e 25 ng de Ni em solução sobre as amostras, anteriormente a aplicação dos procedimentos de digestão. As amostras fortificadas e os brancos analíticos foram submetidos às mesmas condições experimentais que as amostras, descritos nos procedimentos de A, B, C e D. O procedimento de digestão mais adequado para cada tipo de amostra foi escolhido e aplicado para as demais amostras analisadas neste trabalho.

### 3.5 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Durante a otimização das temperaturas de pirólise e atomização para a técnica de HR-CS SS-GF AAS, a comparação entre as médias dos valores de absorvância integrada normalizada foi realizada através da análise de variância (ANOVA) com fator único. A equivalência dos valores de desvio padrão foi testada utilizando o teste de Brown-Forsythe.

De forma similar, a comparação estatística entre os resultados obtidos por HR-CS SS-GF AAS e pelos diferentes procedimentos de digestão foi feita através da ANOVA com fator único. Nos casos em que foi observada diferença significativa entre os resultados a partir da ANOVA, aplicou-se o teste de comparação múltipla de Tukey. O teste t também foi utilizado para verificar se haviam diferenças significativas entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelo procedimento de digestão selecionado para cada tipo de amostra. Todas as avaliações foram feitas com um intervalo de confiança de 95% e com o auxílio do *software* GraphPad Prism, versão 6.01 (Copyright 1992-2012 GraphPad software, Inc.).

A validação do método proposto para a determinação simultânea de Fe e Ni em suplementos alimentares foi realizada conforme as diretrizes da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para o desenvolvimento de métodos analíticos para suplementos alimentares (AOAC, 2013) e de acordo com as diretrizes da *National Association of Testing Authorities* (NATA) para validação e verificação de métodos quantitativos e qualitativos (NATA, 2012). Os testes estatísticos aplicados foram de acordo com o documento de orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGRE-008) publicado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2011). Os parâmetros de mérito avaliados foram: linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

### 3.5.1 Curva de calibração e linearidade

As curvas analíticas para Fe e Ni foram obtidas pelo método de calibração externa e pela técnica de adição do analito, a fim de investigar se a matriz das amostras afeta a quantificação dos analitos em suplementos alimentares. Para a calibração externa, as soluções padrões foram preparadas a partir de diluições adequadas da solução estoque, de modo que o branco e os seis níveis de concentração, medidos em triplicata, ficassem igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse, conforme recomendado pela AOAC e NATA (AOAC, 2013; NATA, 2012). A equação linear da relação da absorvância com a massa dos analitos foi obtida pelo método dos mínimos quadrados (NATA, 2012), com o auxílio do *software* OriginPro 8, versão 8,0724 (Copyright 1991-2007 OriginLab Corporation). A linearidade do método foi observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da massa dos analitos, e avaliada a partir dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) (INMETRO, 2011). A ANOVA foi utilizada para verificar a significância da regressão através do Teste F (nível de confiança de 95%) (INMETRO, 2011).

Os resíduos da regressão foram calculados através da diferença entre os valores de absorvância medidos e os valores de absorvância calculados pela reta ajustada. Estes dados foram utilizados para construção do gráfico dos resíduos como uma função da massa dos analitos (AOAC, 2013). Quando o modelo ajustado é apropriado para os dados, não há padrão aparente de resíduos em relação à variável independente (AMADOR et al., 2011). Os testes de Shapiro Wilk e Brown-Forsythe também foram utilizados para verificar, respectivamente, a normalidade e homocedasticidade dos resíduos, conforme recomendado pelo INMETRO (2011). Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do *software* GraphPad Prism.

As curvas analíticas para Fe e Ni também foram obtidas pela técnica de adição do analito. Para tal, as amostras foram analisadas isoladamente, isto é, sem a adição dos analitos e, posteriormente, quantidades conhecidas dos analitos em solução padrão foram adicionadas às amostras em três níveis de concentração. As medidas foram realizadas em triplicata. Para avaliação dos resultados foi utilizado tratamento estatístico dos dados, com o auxílio do *software* OriginPro 8.

A relação da absorvância com as duas variáveis independentes (massa de amostra e quantidade de analito adicionada) foi obtida através do modelo de regressão linear múltipla dado por:

$$A_i = B + Sa_i + Dm_i + E_i \quad (3)$$

Onde:  $A_i$  é a absorvância para uma massa de amostra  $m_i$  e uma quantidade de analito adicionada  $a_i$  (BAXTER; FRECH, 1990).  $E_i$  é o termo residual, isto é, a diferença entre os valores observados e os calculados pelo modelo. Os parâmetros B, S e D foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados, sendo B a absorvância contribuída pelo branco, S a sensibilidade (em unidades de resposta por unidade de massa de analito) e D a resposta por unidade de massa da amostra. O modelo ajustado é representado graficamente por uma superfície de resposta (plano).

Para avaliar o efeito da matriz das amostras sobre os sinais analíticos, as inclinações das curvas de calibração para Fe e Ni obtidas contra padrões aquosos e pela técnica de adição do analito foram comparadas. Quando as inclinações não são significativamente diferentes (<10%), não há necessidade de compensar efeitos da matriz (NATA, 2012).

### 3.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com as equações (NATA, 2012):

$$LOD = 3\sigma/s \quad (4) \quad LOQ = 10\sigma/s \quad (5)$$

Onde:  $\sigma$  é o desvio padrão de 10 medidas do branco e  $s$  é o coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade do método). As leituras do branco foram feitas de acordo com a técnica “massa zero”, que consiste na introdução da plataforma vazia no forno de grafite aplicando o mesmo programa de temperatura usado nas análises (Tabela 2). Ambos os limites foram calculados para a massa máxima de amostra utilizada neste trabalho.

### 3.5.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade das análises em triplicata das amostras e das soluções padrões, e expressa como desvio padrão relativo (RSD) de cada conjunto de medidas. O valor de RSD foi calculado de acordo com a equação:

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:  $s$  é o desvio padrão calculado a partir de três replicatas, e  $\bar{X}$  é a média dos valores de concentração. Os valores de RSD obtidos foram comparados com os valores calculados ( $RSD_{calc}$ ), de acordo com a equação (AOAC, 2013):

$$RSD_{calc} (\%) = 2C^{-0,15} \quad (7)$$

Onde:  $C$  é a concentração expressa como uma fração de massa. Valores aceitáveis para precisão (expressa como RSD) não devem ultrapassar duas vezes os valores calculados (AOAC, 2013).

### 3.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por testes de adição e recuperação de Fe e Ni nas amostras de suplementos alimentares, utilizando três níveis de fortificação (5, 7,5 e 10 ng de Fe e 50, 75 e 100 pg de Ni). Os testes foram realizados em triplicata e as recuperações foram expressas em porcentagem. Para tal, os valores de absorvância obtidos foram normalizados para 1 mg de amostra. A normalização é necessária devido à impossibilidade de introduzir sempre exatamente a mesma massa de amostra na análise direta por amostragem sólida.

Intervalos de recuperação entre 75 a 120% e 85 a 110% são considerados satisfatórios para a validação do método quando a concentração do analito na amostra for de aproximadamente 1  $\mu\text{g/g}$  e 100  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente (AOAC, 2013).

A exatidão do método também foi avaliada estatisticamente através do método dos mínimos quadrados, plotando-se as concentrações dos analitos determinadas pelo método proposto contra as concentrações determinadas após a digestão das amostras.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

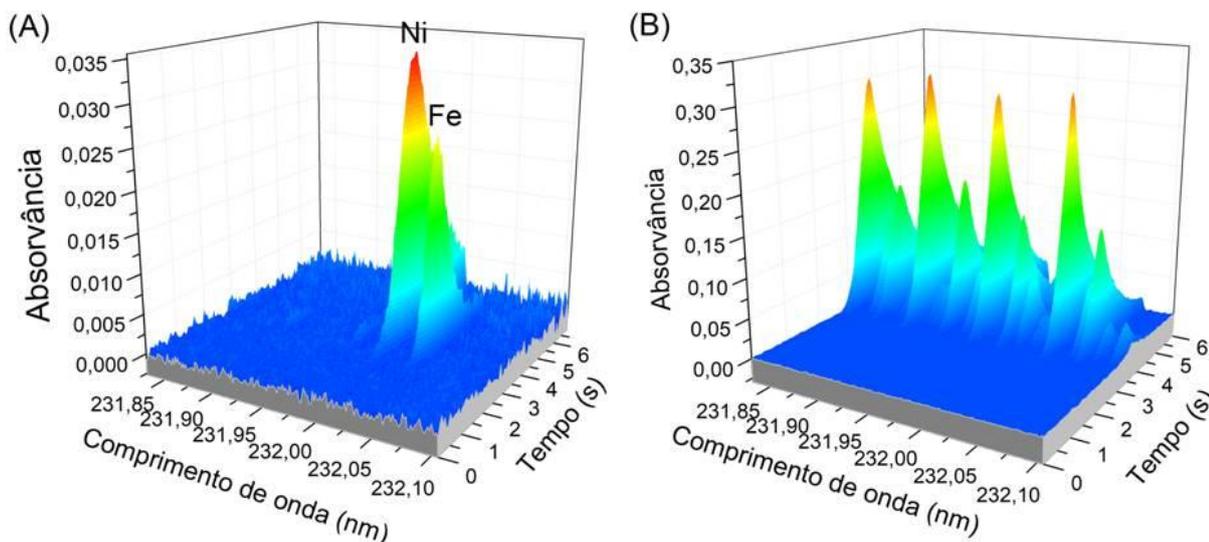
### 4.1 ESCOLHA DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Embora Fe e Ni apresentem diversas linhas atômicas, apenas algumas linhas estão próximas o suficiente para serem monitoradas simultaneamente. Considerando que o Ni está

presente como contaminante nestes tipos de amostras e é esperado em concentrações relativamente mais baixas, priorizou-se a escolha de linhas mais sensíveis para Ni. Por outro lado, o uso de linhas alternativas menos sensíveis para a análise direta de sólidos é vantajoso quando o analito está presente em concentrações relativamente mais elevadas na amostra, como é o caso do Fe. Deste modo, inicialmente foi avaliada a possibilidade da determinação simultânea utilizando a linha secundária de Fe em 232,036 nm (correspondente a 1,4% da sensibilidade relativa da linha de absorção principal de Fe em 248,327 nm) próxima à linha de ressonância primária de Ni em 232,003 nm. O intervalo espectral alcançado pelo detector nesta linha analítica de Ni corresponde a cerca de  $\pm 0,135$  nm, permitindo a determinação simultânea de Fe. Estas linhas de absorção de Fe e Ni investigadas neste trabalho já foram anteriormente utilizadas para a determinação simultânea destes elementos em amostras biológicas (GÓMEZ-NIETO et al., 2013), vegetais (POZZATTI et al., 2017) e fluoropolímeros (SOARES et al., 2016) empregando a técnica de HR-CS SS-GF AAS.

Testes iniciais realizados na amostra representativa de guaraná (GUA-01) mostraram uma resposta satisfatória para estes elementos, uma vez que os perfis dos sinais analíticos obtidos para a amostra foram semelhantes aos obtidos para solução padrão. Adicionalmente, não foram observadas interferências espectrais da matriz da amostra de guaraná, nem interferências de moléculas diatômicas com estrutura rotacional fina dentro da faixa espectral monitorada. Este comportamento pode ser verificado a partir do espectro de absorção resolvido temporalmente na vizinhança da linha de absorção de Ni em 232,003 nm, como mostra a Figura 6. No entanto, testes preliminares realizados na amostra representativa de suplemento vitamínico mineral (SVM-01) mostraram que há sinal de fundo estruturado no intervalo espectral das linhas de absorção selecionadas (Fig. 6B). Este sinal de fundo também foi observado para a amostra TERMO-01.

Figura 6 - Espectro tridimensional na região espectral em  $232,003 \pm 0,135$  nm para as amostras GUA-01 ( $m= 0,267$  mg) (a) e SVM-01 ( $m= 1,850$  mg) (b),  $T_p= 1100$  °C e  $T_a= 2500$  °C.



Fonte: Autora.

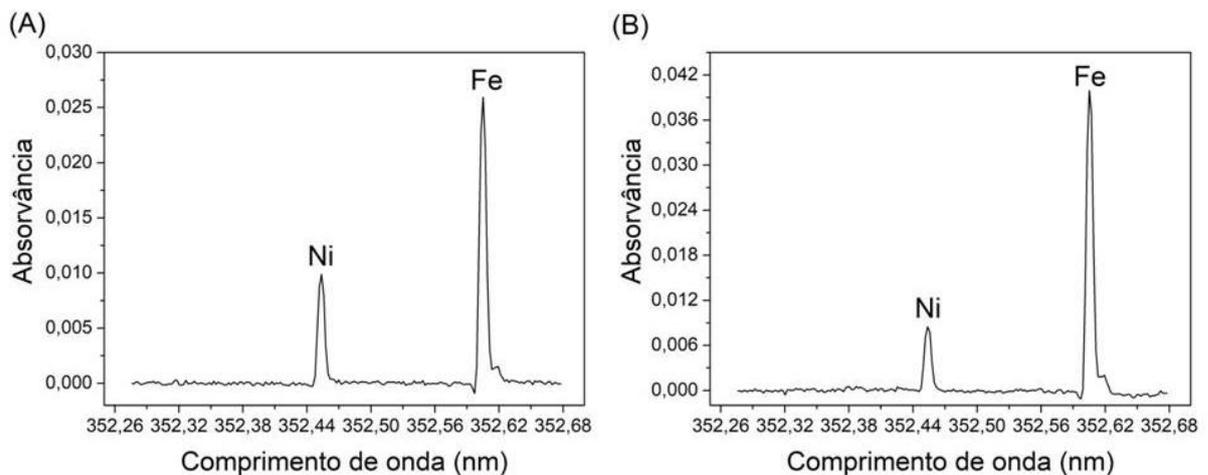
Este problema pode ser facilmente resolvido, uma vez que as estruturas que aparecem na vizinhança das linhas analíticas correspondem à absorção molecular, mais especificamente, ao espectro de excitação de elétrons de uma ou mais moléculas diatômicas com estrutura rotacional fina (ARAUJO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2005). Em alguns casos, a sobreposição espectral pode ser evitada através da otimização do programa de temperatura ou através da subtração de um espectro de referência do espectro da amostra usando um algoritmo de mínimos quadrados para correção de fundo. Como resultado, a absorção molecular é corrigida e os sinais atômicos dos analitos permanecem visíveis (LEPRI et al., 2010; WELZ et al., 2010b).

Neste caso, o sinal de fundo estruturado no intervalo espectral das linhas de absorção selecionados provavelmente está associado à molécula diatômica SiO, pois o Si está presente na matriz da amostra e esta molécula possui bandas de absorção molecular na região de interesse, como já foi anteriormente descrito (GÓMEZ-NIETO et al., 2013; LEPRI et al., 2010; POZZATTI et al., 2017). No entanto, não foram realizados estudos para confirmar a origem deste sinal de fundo estruturado. Como alternativa, optou-se por avaliar a possibilidade da determinação simultânea de Fe e Ni em outra faixa espectral com o objetivo de simplificar o método.

Os melhores resultados foram obtidos para a linha de absorção de Ni em 352,454 nm, usada como linha principal. O intervalo espectral alcançado pelo detector corresponde a cerca de  $\pm 0,2$  nm em ambos os lados desta linha analítica de Ni, permitindo a determinação

simultânea de Fe em 352,604 nm. Estas linhas de Ni e Fe são, respectivamente, cerca de 5,3 e 870 vezes menos sensíveis que as linhas primárias para estes elementos, o que as torna adequadas para este propósito considerando a abundância esperada dos analitos nestes tipos de amostras. A Figura 7 mostra o espectro obtido para a determinação simultânea de Fe e Ni em solução aquosa e na amostra SVM-01 nestas condições. Vale ressaltar que resultados semelhantes foram obtidos para as amostras GUA-01 e TERMO-01.

Figura 7 - Absorvância integrada em função do comprimento de onda para 400 pg de Ni e 40 ng de Fe em solução (A) e para a amostra SVM-01 ( $m = 1,535$  mg) (B) em 352,454 nm para Ni e 352,604 nm para Fe,  $T_p = 1100$  °C e  $T_a = 2500$  °C.



Fonte: Autora.

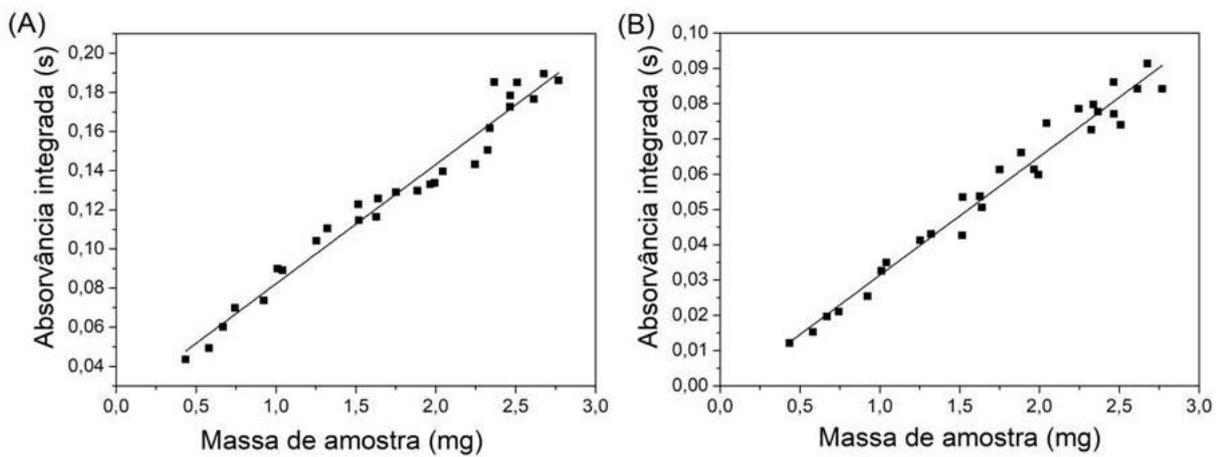
#### 4.2 INFLUÊNCIA DA MASSA DE AMOSTRA

A influência da massa das amostras representativas em relação aos valores de absorvância medidos para cada analito foi investigada avaliando-se a linearidade de resposta de um gráfico de absorvância integrada versus massa de amostra pesada. O sinal analítico também foi avaliado quanto ao perfil do pico e a ausência de interferências espectrais. A Figura 8 mostra os resultados obtidos para a amostra SVM-01. Como resultado, obteve-se uma correlação linear de 0,435 até 2,769 mg da amostra SVM-01 para Fe ( $R = 0,983$ ) e Ni ( $R = 0,983$ ). A Figura 9 mostra a sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe e Ni com a utilização de diferentes massas da amostra SVM-01. É possível observar que a liberação dos analitos é prejudicada quando quantidades maiores de massa são introduzidas no atomizador, resultando no deslocamento temporal do sinal bem como alargamento do pico. Este efeito é mais pronunciado para Ni e, como consequência, seria necessário a utilização de

um tempo mais longo para que a vaporização do analito fosse completa na etapa de atomização.

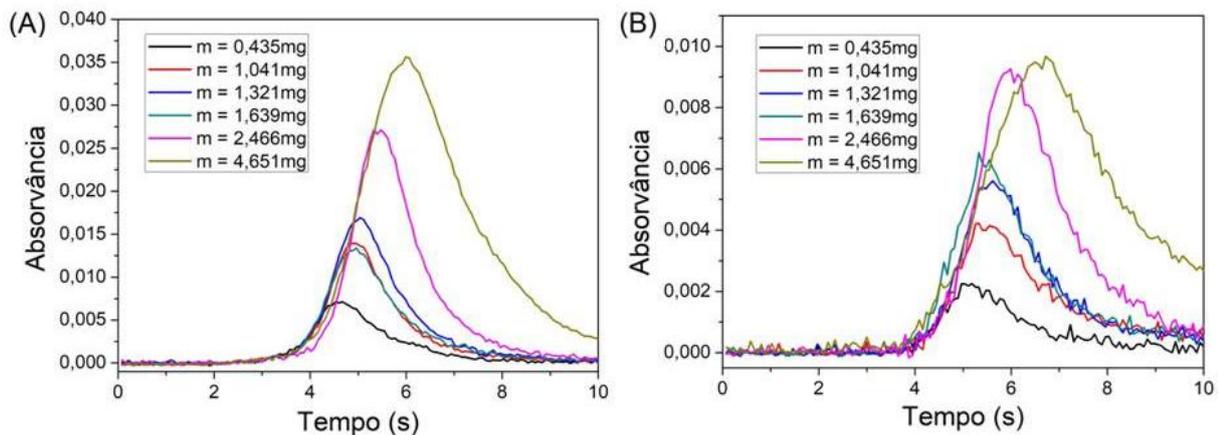
Outra consequência da utilização de massas maiores de amostra (acima de aproximadamente 2 mg) é que um resíduo persiste na plataforma mesmo após a etapa de limpeza. Este resíduo foi analisado e não foi obtido sinal de absorvância para Fe e Ni. De forma similar, a análise da amostra conduzida na presença deste resíduo e após a sua remoção evidenciou que não há interferências significativas devido à compostos de carbono ou efeito de memória para os analitos. Deste modo, a presença deste resíduo não é considerada um problema, pois não ataca a plataforma e pode ser facilmente removido.

Figura 8 - Dependência do sinal de absorvância integrada para Fe (A) e Ni (B) com diferentes massas da amostra SVM-01 introduzidas no forno de grafite,  $T_p = 1100$  °C e  $T_a = 2500$  °C.



Fonte: Autora.

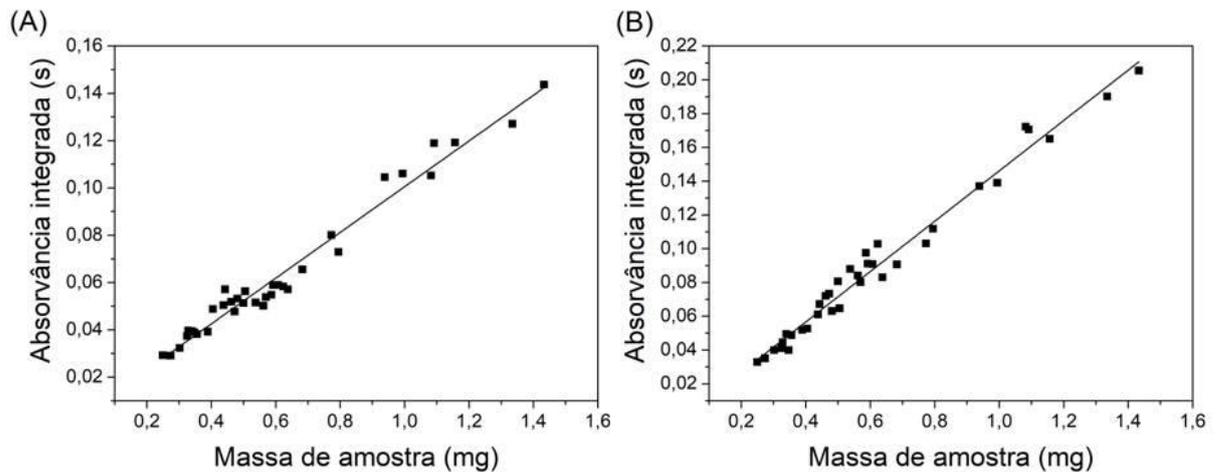
Figura 9 - Sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe (A) e Ni (B) com a utilização de diferentes massas da amostra SVM-01,  $T_p = 1100$  °C e  $T_a = 2500$  °C.



Fonte: Autora.

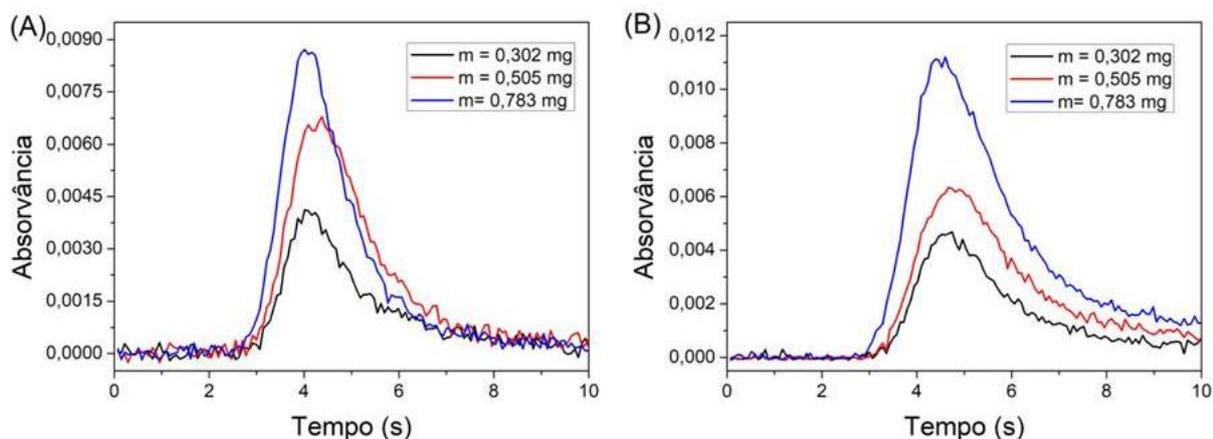
De forma similar ao observado para a amostra SVM-01, a análise de massas superiores a 0,8 mg da amostra GUA-01 resulta na formação de resíduo na plataforma que, ao ser analisado, também não mostrou interferências significativas ou efeito de memória para os analitos. Todavia, com massas superiores a 1,5 mg há um aumento da influência do resíduo da matriz presente no atomizador que dificultou a vaporização de Fe e Ni, levando a valores de absorvância subestimados. Devido a este fato, apesar da plataforma suportar massas maiores de amostra, a faixa linear de massa a ser utilizada foi limitada, obtendo-se uma correlação linear de 0,25 a 1,433 mg de amostra para Fe ( $R = 0,985$ ) e Ni ( $R = 0,988$ ), como mostra a Figura 10. A Figura 11 mostra a sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe e Ni com a utilização de diferentes massas da amostra GUA-01. Ao contrário do observado para a amostra SVM-01, a liberação dos analitos para a amostra GUA-01 não é prejudicada com a utilização de massas dentro do intervalo avaliado.

Figura 10 - Dependência do sinal de absorvância integrada para Fe (A) e Ni (B) com diferentes massas da amostra GUA-01 introduzidas no forno de grafite,  $T_p = 1100$  °C e  $T_a = 2500$  °C.



Fonte: Autora.

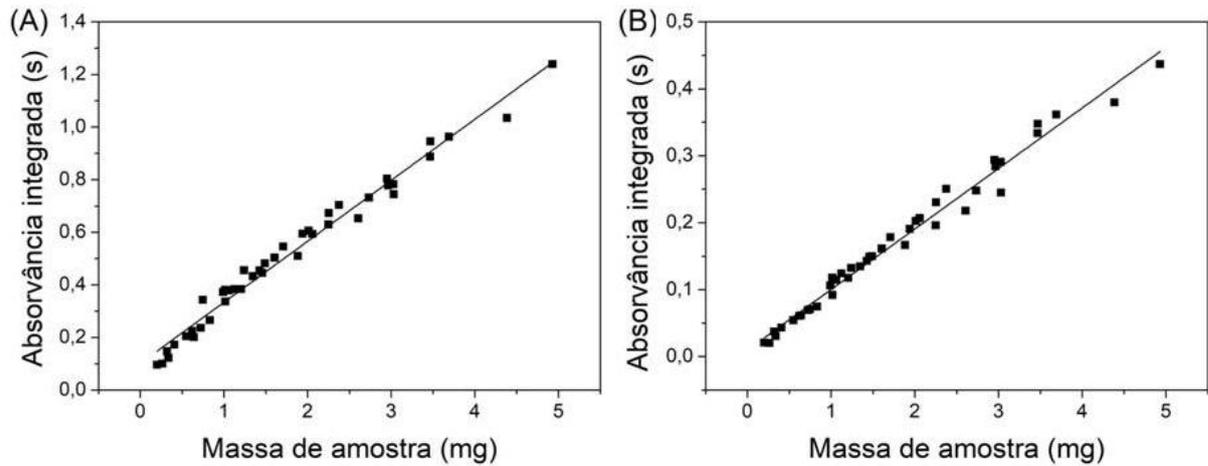
Figura 11 - Sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe (a) e Ni (b) com a utilização de diferentes massas da amostra GUA-01,  $T_p = 1100\text{ °C}$  e  $T_a = 2500\text{ °C}$ .



Fonte: Autora.

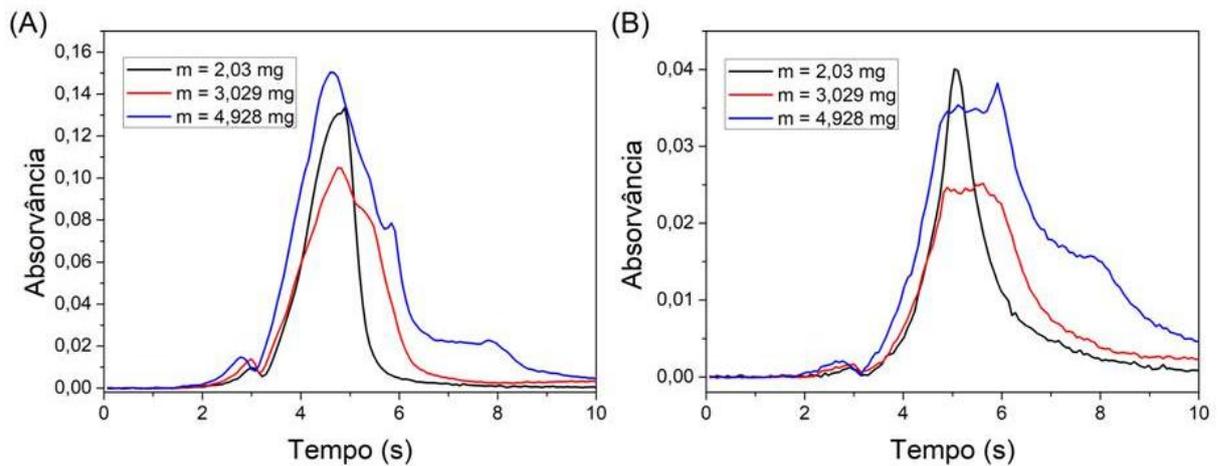
Para a amostra TERMO-01 obteve-se uma correlação linear de 0,199 a 4,928 mg de amostra para Fe ( $R = 0,989$ ) e Ni ( $R = 0,991$ ), como mostra a Figura 12. No entanto, a utilização de massas superiores a 3,0 mg de amostra resulta na deformação de ambos os picos, indicando que há um aumento da influência do resíduo da matriz presente no atomizador, como mostra a Figura 13. Obviamente, este efeito observado aumenta conforme massas maiores de amostra são adicionadas. Acima de 5,0 mg de amostra, a ineficiente eliminação da matriz na etapa de pirólise fez com que o sólido remanescente fosse vaporizado durante a etapa de atomização, resultando no aparecimento de fumaça no interior do tubo de grafite. Como consequência do espalhamento da radiação pelas partículas formadas, observou-se um fundo contínuo precedendo o sinal atômico que não pôde ser corrigido corretamente, como mostra a Figura 14. Após a etapa de limpeza, a análise da plataforma vazia revelou que houve efeito de memória para ambos os elementos. Cabe ressaltar que não foi observada interferência por espalhamento da radiação na etapa de atomização ou efeito de memória quando massas menores da amostra TERMO-01 foram utilizadas.

Figura 12 - Dependência do sinal de absorvância integrada para Fe (A) e Ni (B) com diferentes massas da amostra TERMO-01 introduzidas no forno de grafite,  $T_p=1100\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_a=2500\text{ }^\circ\text{C}$ .



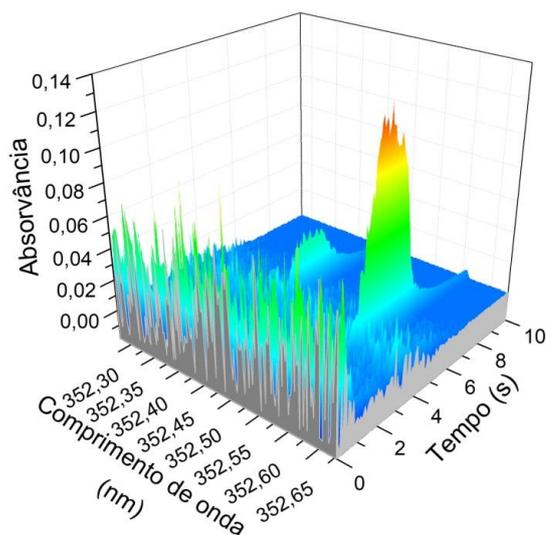
Fonte: Autora.

Figura 13 - Sobreposição dos sinais transientes no pixel central para Fe (A) e Ni (B) com a utilização de diferentes massas da amostra TERMO-01,  $T_p=1100\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_a=2500\text{ }^\circ\text{C}$ .



Fonte: Autora.

Figura 14 - Espectro resolvido no tempo obtido por HR-CS SS-GF AAS na região espectral em  $352,454 \pm 0,2$  nm para a amostra TERMO-01 ( $m = 5,341$  mg),  $T_p = 1100$  °C e  $T_a = 2500$  °C.



Fonte: Autora.

Estes resultados sugerem que a influência da massa introduzida no atomizador depende natureza da amostra. Deste modo, foi selecionado o intervalo de massa para cada tipo de amostra considerado mais adequado para análise, tendo como critérios a intensidade e o perfil dos sinais analíticos bem como a massa máxima que pode ser introduzida no GF sem que haja influência significativa da matriz. Assim, todas as análises posteriores foram realizadas utilizando massas de amostra nos seguintes intervalos: 0,25 a 1,4 mg para as amostras de guaraná, 0,5 a 2,8 mg para as amostras de SVM e 0,3 a 2,0 mg para as amostras de termogênicos à base de cafeína.

#### 4.3 HOMOGENEIDADE

Para avaliar a homogeneidade das amostras, os intervalos de massas anteriormente selecionados (item 4.2) foram divididos em intervalos menores. Os sinais de absorvância integrados foram normalizados para 1 mg de amostra e os desvios padrões relativos de cinco medidas sucessivas para cada amostra foram usados para calcular o fator de homogeneidade, apresentado na Tabela 4. Uma vez que o fator de homogeneidade calculado é inferior a 10, as amostras podem ser consideradas homogêneas e as faixas de massa selecionadas (0,25 a 1,4 mg para as amostras de guaraná, 0,5 a 2,8 mg para as amostras de SVM e 0,3 a 2,0 mg para as amostras de termogênicos à base de cafeína ) são adequadas para a análise.

Tabela 4 - Fator de homogeneidade calculado ( $H_c$ ) para as amostras representativas SVM-01, GUA-01 e TERMO-01 ( $n = 5$ ).

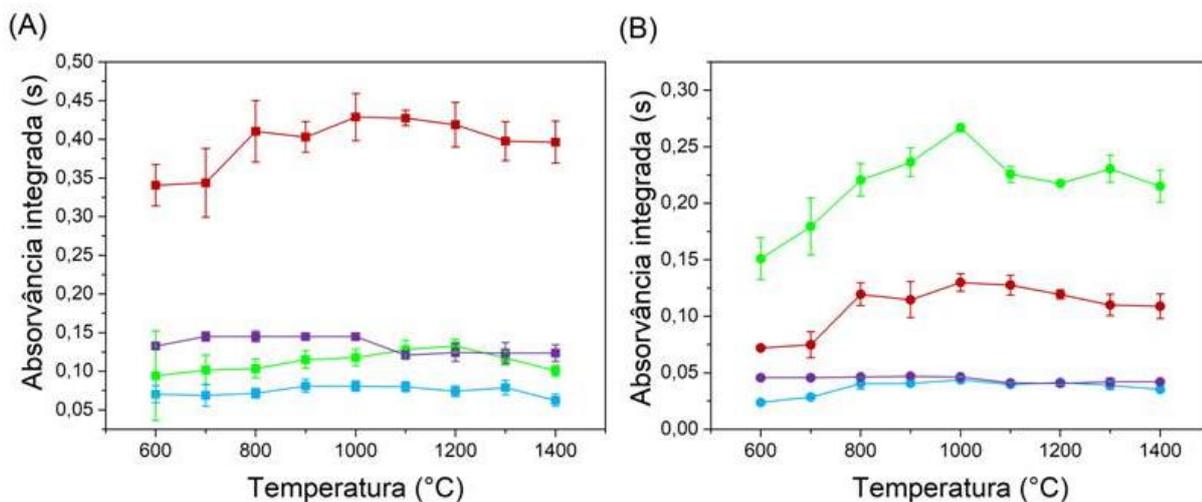
Amostra	Intervalo de massa (mg)	$H_c$ ( $\text{mg}^{1/2}$ )	
		Fe	Ni
SVM-01	0,435 – 0,924	8,73	3,63
	1,010 – 1,515	3,52	6,73
	1,519 – 1,886	4,33	5,61
	1,993 – 2,325	2,93	8,41
	2,339 – 2,676	5,06	4,26
	2,509 – 2,769	5,32	4,50
GUA-01	0,250 – 0,329	5,54	2,74
	0,340 – 0,405	6,88	8,49
	0,438 – 0,481	8,90	7,45
	0,500 – 0,570	8,70	9,90
	0,587 – 0,638	4,07	9,50
	0,654 – 0,994	7,08	3,24
TERMO-01	1,082 – 1,433	5,30	5,53
	0,199 – 0,407	9,55	9,65
	0,549 – 0,748	7,58	1,73
	0,832 – 1,061	7,30	9,07
	1,124 – 1,427	6,31	5,23
	1,458 – 1,883	6,96	6,24
	1,941 – 2,253	3,60	6,19

#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO

Ferro e Ni são termicamente estáveis e possuem volatilidades semelhantes e, deste modo, é possível estabelecer um programa de temperatura comum para estes analitos no qual as temperaturas de pirólise e atomização são próximas dos valores ótimos para cada elemento, permitindo a determinação simultânea dos mesmos. As curvas do sinal analítico versus temperatura foram obtidas através do uso de uma solução padrão de Fe ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e Ni ( $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) e das amostras representativas SVM-01, GUA-01 e TERMO-01 para definir as melhores temperaturas de pirólise e atomização. Inicialmente, a temperatura de atomização foi fixada em  $2500 \text{ } ^\circ\text{C}$  e a temperatura de pirólise foi avaliada na faixa de  $600$  a  $1400 \text{ } ^\circ\text{C}$ , com um tempo

de aquecimento de 10 s e sem o uso de modificadores químicos. A Figura 15 mostra as curvas de pirólise obtidas para Fe e Ni nestas condições.

Figura 15 - Curva de pirólise obtida para Fe (A) e Ni (B) em solução padrão contendo 400pg de Ni e 40ng de Fe (—) e para as amostras TERMO-01 (—), GUA-01 (—) e SVM-01 (—) ( $n = 3$ ),  $T_a = 2500\text{ }^\circ\text{C}$ . Os valores de absorvância integrada para as amostras sólidas foram normalizados para 1 mg de amostra.



Fonte: Autora.

Em solução padrão, não foi observada diferença significativa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) nos valores de absorvância integrada obtidos nas faixas de temperatura de 700 a 1000 °C e 600 a 1000 °C para Fe e Ni, respectivamente. Acima desta temperatura observa-se um pequeno decréscimo nos valores de absorvância para ambos os analitos. Um comportamento semelhante para Ni foi observado na amostra GUA-01, para a qual o maior sinal foi obtido na temperatura de pirólise de 1000 °C, ocorrendo perda do analito em temperaturas superiores. A situação para Fe nesta amostra é diferente, isto é, a curva de pirólise obtida para este elemento mostra que a matriz da amostra GUA-01 estabiliza o analito a uma temperatura de pirólise que é cerca de 300 °C superiores à obtida para solução padrão, uma vez que não foram observadas diferenças significativas para os valores de absorvância de Fe entre 800 a 1300 °C quando a amostra sólida foi analisada.

De forma similar, as curvas de pirólise obtidas para Fe e Ni mostram que a matriz das amostras SVM-01 e TERMO-01 também proporciona a estabilização térmica de ambos os analitos. Para Ni, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos valores de absorvância integrada obtidos na faixa de temperatura de 800 a 1400°C quando ambas as amostras foram analisadas. Já para Fe, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos valores de absorvância integrada obtidos nas faixas de temperatura de 600 a 1300

°C e 800 a 1400 °C quando, respectivamente, as amostras SVM-01 e TERMO-01 foram analisadas. Deste modo, uma temperatura de pirólise de 1000 °C foi escolhida como temperatura de compromisso para ambos os analitos tanto na presença quanto na ausência da matriz das amostras.

Este efeito de estabilização térmica ocasionado pela matriz da amostra também foi observado por Resano e colaboradores (2013), durante o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de Co, Fe, Ni e Pb em nanotubos de carbono. De acordo com os autores, como Co, Fe e Ni não são muito voláteis, as curvas de pirólise correspondentes mostraram que não há perda dos analitos até 1400 °C, mesmo na ausência de modificadores químicos. No entanto, quando a amostra sólida foi analisada, não foram detectadas perdas destes elementos até uma temperatura de pirólise de 1600 °C devido á estabilização ocasionada pela matriz da amostra. Dittert e colaboradores (2009) realizaram a determinação simultânea de Fe e Cr em óleo cru e, segundo os autores, as curvas de pirólise mostraram que a matriz da amostra estabiliza ambos os analitos a temperaturas de pirólise que são aproximadamente 300 °C superiores comparadas àquelas obtidas para solução padrão.

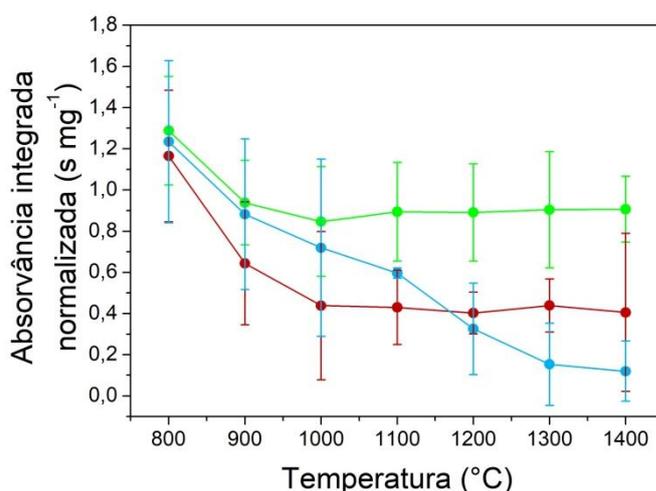
A influência do tempo de permanência na etapa de pirólise foi estudada entre 10 e 30 segundos. Independente da amostra analisada, o aumento da duração desta etapa resultou no decréscimo dos valores de absorvância integrada para Fe e Ni. Por este motivo, o tempo de pirólise foi mantido em 10 s.

Além da volatilidade dos analitos, outro fator importante a ser considerado é a volatilidade da matriz, sobretudo na amostragem direta de sólidos, uma vez que toda a matriz da amostra está presente no atomizador (BELARRA et al., 2002; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014). A vaporização simultânea de alguns compostos juntamente com os analitos pode resultar em um aumento do sinal de fundo, como absorção molecular ou espalhamento da radiação por partículas sólidas, bem como o aumento do risco de interferências (BELARRA et al., 2002; BELARRA et al., 2003). Na prática, há três possíveis situações que podem ocorrer durante o desenvolvimento de um método baseado na amostragem direta de sólidos, isto é, os analitos apresentarem uma volatilidade diferente, menor ou maior, do que a maioria dos componentes da matriz ou apresentarem uma volatilidade semelhante aos compostos da matriz (BELARRA et al., 2003; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014).

Se a matriz das amostras é mais volátil que os analitos, a otimização adequada da etapa de pirólise torna-se extremamente importante, uma vez que grande parte da matriz das amostras pode ser eliminada nesta etapa. Deste modo, os possíveis efeitos da matriz podem

ser evitados através da atomização seletiva dos analitos em relação à vaporização da matriz, de modo que é possível obter sinais comparáveis aos obtidos para soluções aquosas (BELARRA et al., 2003; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014). Deste modo, o sinal de fundo produzido pelas amostras também foi avaliado através de curvas da absorvância normalizada versus temperatura de pirólise, variando a temperatura na faixa de 800 a 1400 °C, como mostra a Figura 16.

Figura 16 – Variação do sinal de fundo para as amostras SVM-01 (—), GUA-01 (—) e TERMO-01 (—) com a aplicação de diferentes temperaturas de pirólise (n = 3).



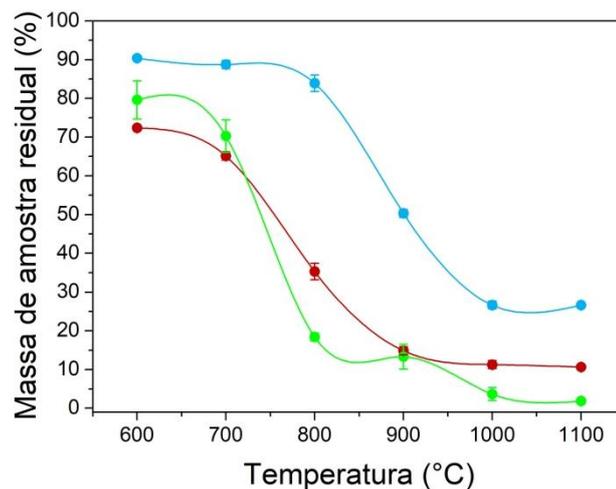
Fonte: Autora.

Como pode ser visto na Figura 16, com uma temperatura de pirólise de 800 °C, os sinais de fundo para as amostras apresentam altos valores de absorvância devido à ineficiente eliminação da matriz das amostras com a aplicação desta temperatura, resultando na vaporização simultânea de alguns compostos durante a atomização dos analitos. Para as amostras GUA-01 e TERMO-01, a partir de 900 e 1000 °C, respectivamente, os valores dos sinais de fundo permanecem praticamente constantes mesmo com o aumento da temperatura, indicando que grande parte da matriz destas amostras pode ser eliminada com a aplicação de uma temperatura de pirólise de 1000 °C. Para a amostra SVM-01, os sinais de fundo diminuem à medida que a temperatura de pirólise aumenta, obtendo-se o menor valor em 1400 °C.

O efeito da temperatura de pirólise em relação à eliminação da matriz também foi avaliado através do estudo de perda de massa relativa. Este estudo foi realizado com o objetivo de se obter informação complementar sobre as curvas de pirólise. As amostras foram pesadas diretamente na plataforma para amostragem sólida e a temperatura de pirólise foi

avaliada entre 600 e 1100 °C. O programa de aquecimento utilizado foi constituído de uma etapa de secagem (120 °C, 5 °C s<sup>-1</sup>, 10 s) e uma etapa de pirólise na qual a temperatura variou de 600 a 1100 °C, com tempo de duração de 10 s. Após cada etapa de pirólise, o programa de aquecimento foi interrompido e a plataforma contendo o resíduo das amostras foi pesada novamente. Os resultados foram expressos graficamente utilizando o percentual de massa residual de amostra relativo à massa inicial presente na plataforma, como uma função da temperatura de pirólise, conforme mostra a Figura 17.

Figura 17 - Perda de massa relativa para as amostras SVM-01 (—), GUA-01 (—) e TERMO-01 (—) durante a etapa de pirólise com a aplicação de diferentes temperaturas (n = 3).



Fonte: Autora.

Como pode ser observado na Figura 17, o perfil de perda de massa foi muito semelhante para as três amostras avaliadas. Uma significativa eliminação da matriz começa a ocorrer em 800 °C para as amostras GUA-01 e TERMO-01 e em 900 °C para a amostra SVM-01. Neste caso, um pequeno resíduo permanece na plataforma, correspondente a uma perda de massa de aproximadamente 50% para a amostra SVM-01, 65% para a amostra TERMO-01 e 82% para a amostra GUA-01. A aplicação de uma temperatura de pirólise de 1000 °C resultou na eliminação de aproximadamente 75, 90 e 92% da matriz das amostras SVM-01, TERMO-01 e GUA-01, respectivamente. Esses valores mantiveram-se praticamente inalterados mesmo com o aumento da temperatura para 1100 °C. Logo, a temperatura de 1000 °C é suficiente para decompor e remover termicamente grande parte dos componentes voláteis da matriz das amostras. Este resultado está de acordo com a variação do sinal de fundo para as amostras sólidas (Figura 16).

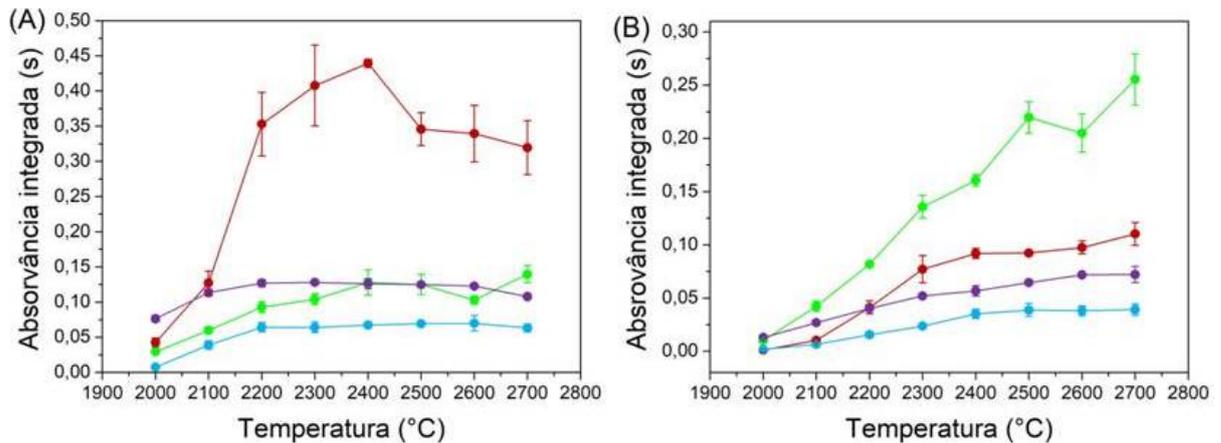
Devido à inerente estabilidade térmica de Fe e Ni, o uso de modificadores químicos para prevenir a perda dos analitos não foi necessário. Adicionalmente, nos casos em que foram observados um efeito de estabilização térmica causado pela própria matriz das amostras, o uso de modificadores químicos poderia “sobre-estabilizar” os analitos, dificultando ainda mais a atomização dos mesmos.

Embora algumas pesquisas encontradas na literatura proponham o uso de paládio ou  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  para a determinação de Fe e Ni (BRANDÃO et al., 2006; KRAWCZYK, 2014; RESANO et al., 2011), diversos estudos têm demonstrado que o uso de modificadores químicos na determinação destes elementos em diferentes tipos de amostras muitas vezes não é necessário. Como, por exemplo, na determinação direta e simultânea de Fe e Ni em amostras biológicas, onde foi observado que ambos os analitos são estáveis até uma temperatura de pirólise de 1200 °C (GÓMEZ-NIETO et al., 2013). Do mesmo modo, o uso de modificadores químicos também foi dispensável na determinação individual de Ni e Fe em amostras de carvão ativado e negro de fumo (LEPRI et al., 2010), na determinação de Fe em biodiesel (QUADROS et al., 2011) e na determinação de Ni em amostras de vitamina B 12 (ADOLFO et al., 2016), amostras de carne (DE ANDRADE et al., 2017), amostras de chá preto (SHALTOUT et al., 2013), formulações farmacêuticas e matérias-primas de uso farmacêutico (DE PAULA et al., 2012).

Adicionalmente, Pd, Pd/Mg e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  foram investigados como modificadores químicos na determinação direta e simultânea de Fe e Ni em vegetais da família Solanaceae e não foram observadas vantagens significativas em relação aos valores de absorvância ou ao perfil do sinal analítico (POZZATTI et al., 2017). Do mesmo modo, também não foram observados efeitos significativos durante a investigação de Mg como modificador químico para a determinação de Fe em amostras de farinha (DOS SANTOS et al., 2017).

Após a otimização da etapa de pirólise, a temperatura de atomização foi avaliada em uma faixa de 2000 a 2700 °C, com tempo de integração de 10 s. A Figura 18 mostra as curvas de atomização obtidas para Fe e Ni em solução padrão e nas amostras representativas nestas condições.

Figura 18 - Curva de atomização obtida para Fe (a) e Ni (b) em solução padrão contendo 400pg de Ni e 40ng de Fe (—) e para as amostras TERMO-01 (—), GUA-01 (—) e SVM-01 (—) (n = 3),  $T_p = 1000\text{ }^\circ\text{C}$ .



Fonte: Autora.

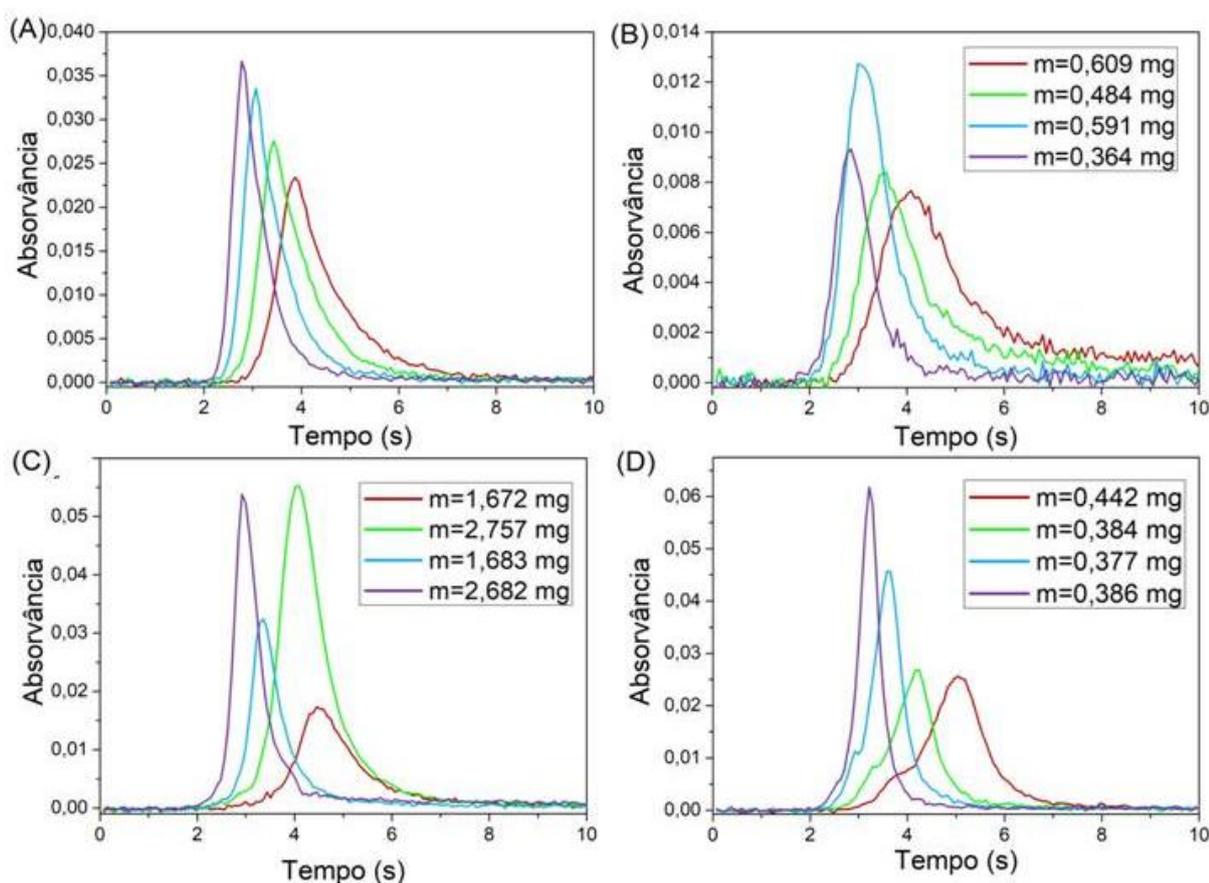
O perfil das curvas de atomização obtidas para Ni nas amostras é semelhante ao obtido para este elemento em solução padrão. A absorvância aumenta rapidamente com o aumento da temperatura, alcançando os valores máximos entre 2600 e 2700 °C. Para Fe em solução padrão e na amostra SVM-01, não foi observada diferença significativa (ANOVA,  $p > 0,05$ ) nos valores de absorvância integrada obtidos na faixa de 2200 a 2600 °C, havendo um pequeno decréscimo na intensidade em 2700 °C. Para as amostras TERMO-01 e GUA-01, os maiores valores de absorvância de Fe foram obtidos em 2400 e 2700 °C, respectivamente.

Tanto para as amostras quanto para solução padrão, nas faixas de temperatura de 2000 a 2300 °C e 2000 a 2400 °C ocorre um deslocamento temporal dos sinais analíticos obtidos para Fe e Ni, respectivamente, proveniente de um efeito cinético de liberação dos analitos para a fase gasosa. Além disso, os sinais transientes apresentam um perfil alargado e não retornam a linha base, indicando que a atomização dos analitos é incompleta nestas temperaturas.

A partir de uma temperatura de 2400 °C, os sinais transientes obtidos para Fe em solução padrão (Fig. 19A) e nas amostras GUA-01 (Fig. 19B) e SVM-01 (Fig. 19C) retornam completamente à linha base e tornam-se cada vez mais estreitos com o aumento da temperatura, indicando uma atomização eficiente deste analito. Por outro lado, apesar da absorvância máxima para Fe na amostra TERMO-01 ter sido obtida em 2400 °C, nesta temperatura observa-se que o sinal analítico apresenta um “ombro”, provavelmente devido ao processo de atomização não satisfatório para Fe nesta amostra (Fig. 19D). Apesar de estar sob as mesmas condições e propriedades termo-físicas do forno, o mecanismo de atomização do

analito na amostra e no padrão aquoso podem distinguir devido à energia de ligação entre o analito e os concomitantes da matriz, resultando em diferentes formatos do perfil do sinal transiente. Esta deformação do sinal foi observada até 2600 °C, porém, com a aplicação de uma temperatura de atomização de 2700 °C este problema foi completamente resolvido, obtendo-se uma melhora significativa do sinal transiente de Fe nesta amostra.

Figura 19 - Sobreposição dos sinais transientes de Fe no pixel central para solução padrão (A) e para as amostras GUA-01 (B), SVM-01 (C) e TERMO-01 (D),  $T_p = 1000$  °C,  $T_a = 2400$  °C (—), 2500 °C (—), 2600 °C (—) e 2700 °C (—).



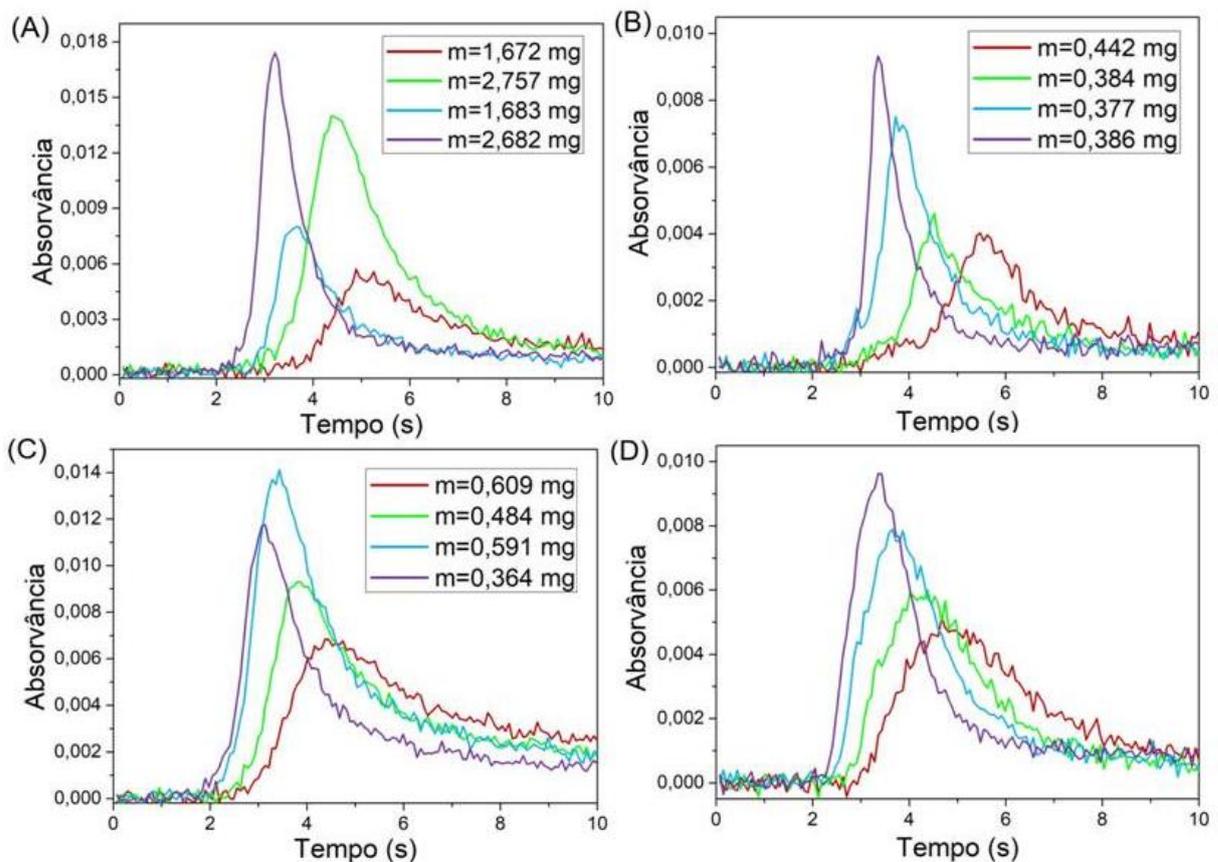
Fonte: Autora.

À medida que a temperatura de atomização aumenta de 2400 a 2600 °C são obtidos picos mais simétricos para Ni quando as amostras SVM-01 (Fig. 20A) e TERMO-01 (Fig. 20B) são analisadas. No entanto, nesta faixa de temperatura é observado que o pico obtido para Ni na amostra GUA-01 (Fig. 20C) e em solução aquosa (Fig. 20D) ainda apresenta um perfil alargado. O mesmo foi observado para a determinação de Ni em solução aquosa em um estudo no qual os autores avaliaram o uso de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  e W como modificadores químicos na tentativa de reduzir este efeito. Porém, não foi observada melhora significativa quanto ao perfil do sinal analítico e a determinação deste elemento foi realizada

sem o uso de modificador, utilizando uma temperatura de atomização de 2600 °C (DE GOIS et al., 2016).

No presente trabalho, obteve-se uma maior eficiência de atomização com a utilização de uma temperatura de 2700 °C, que resultou numa melhora significativa no perfil do sinal transiente obtido para Ni em solução padrão e nas amostras. Nesta temperatura foram obtidos sinais mais estreitos e simétricos para Fe e Ni, cujas formas e perfil temporal são muito semelhantes para as amostras e padrão aquoso, confirmando que esta temperatura é adequada para a atomização de ambos os elementos nos diferentes tipos de amostras bem como em solução padrão.

Figura 20 - Sobreposição dos sinais transientes de Ni no pixel central para as amostras SVM-01 (A), TERMO-01 (B) e GUA-01 (C) e para solução padrão (D),  $T_p = 1000$  °C,  $T_a = 2400$  °C (—), 2500 °C (—), 2600 °C (—) e 2700 °C (—).



Fonte: Autora.

A etapa de limpeza do forno de grafite e da plataforma para amostragem sólida foi realizada em uma temperatura de 2720 °C. Não foram obtidos sinais de absorvância para a análise da plataforma vazia após as amostras terem sido submetidas ao programa de aquecimento, provando que a aplicação do programa de temperatura otimizado aliado à

utilização de uma faixa de massa adequada para cada tipo de amostra permite a vaporização completa dos analitos na etapa de atomização.

#### 4.5 INTERFERÊNCIAS ESPECTRAIS

Frequentemente, durante o processo de tratamento da amostra, uma parte significativa da matriz é removida. Conseqüentemente, os analitos são separados da matriz e a amostra introduzida no forno de grafite contém menos compostos do que a amostra original. Por outro lado, na amostragem direta de sólidos, toda a matriz da amostra está presente no atomizador e, em alguns casos, a vaporização simultânea de alguns compostos da matriz juntamente com os analitos pode levar a um aumento do sinal de fundo (BELARRA et al., 2002).

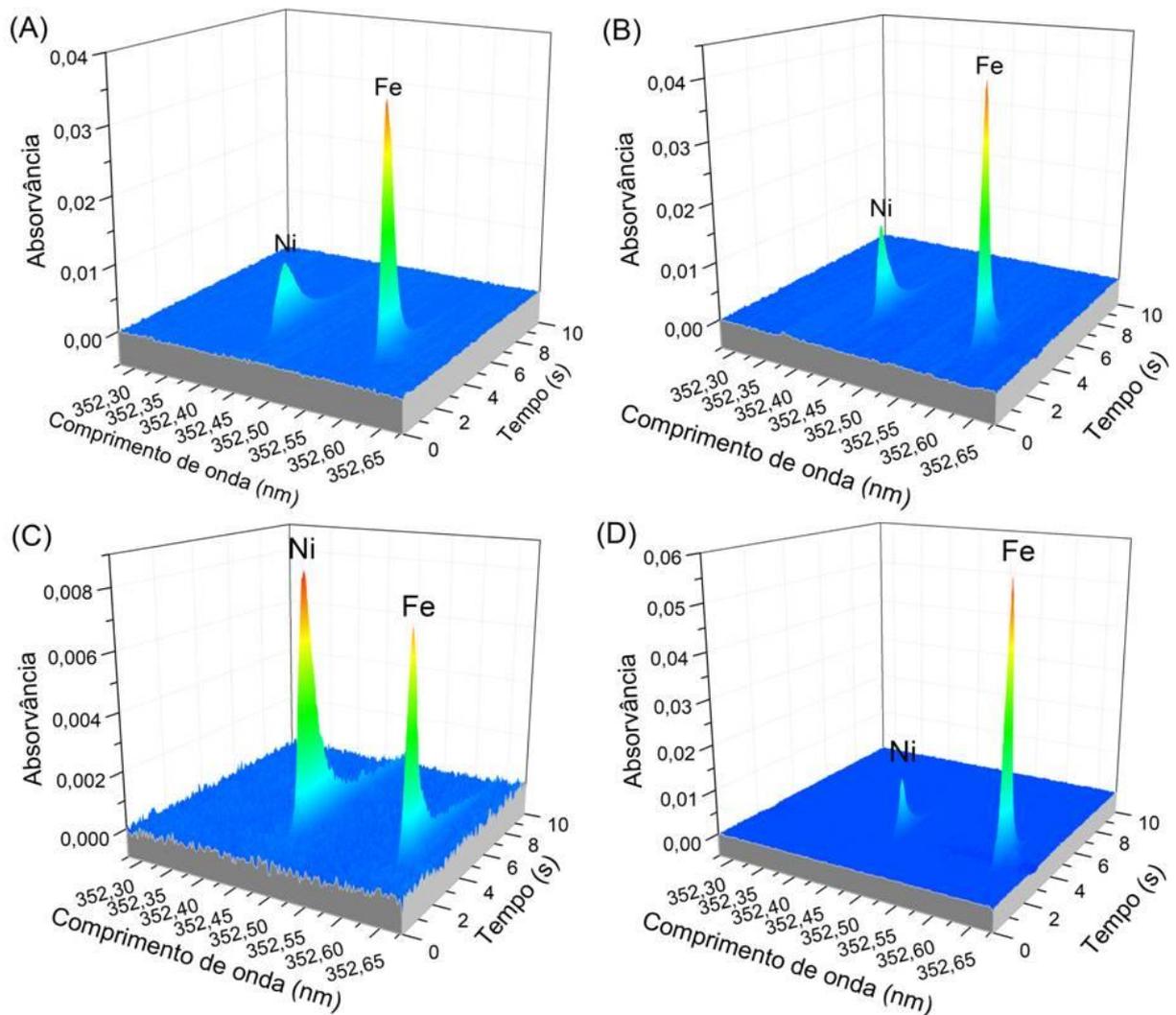
No entanto, uma das grandes vantagens em HR-CS AAS é a possibilidade de corrigir automaticamente os eventos espectrais que são considerados contínuos na faixa espectral avaliada, ou seja, eventos que afetam simultaneamente e com a mesma intensidade todos os pixels do detector, como flutuações da intensidade da lâmpada ou o espalhamento da radiação por componentes da matriz. Após a correção automática dos eventos contínuos, todos os eventos espectrais descontínuos permanecem visíveis, isto é, absorção atômica devido aos analitos e contaminantes e a absorção molecular devido às moléculas diatômicas que possuam estrutura rotacional fina (ARAUJO et al., 2009; BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2007a; WELZ et al., 2010a).

Devido à temperatura do atomizador, apenas algumas moléculas diatômicas com energias de dissociação muito altas podem existir, entre elas as moléculas de SiO (WELZ et al., 2009 ;WELZ et al., 2010a; WELZ et al., 2010b). O dióxido de silício, empregado como antiumectante, está presente na matriz das amostras, o que poderia levar ao aparecimento de sinal de fundo estruturado proveniente de espectros de excitação eletrônica das moléculas diatômicas com estrutura rotacional fina SiO. No entanto, a sobreposição espectral com tais moléculas diatômicas é mais frequente nas regiões de comprimentos de onda curto (210 a 260 nm) (RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2014; WELZ et al., 2005). Deste modo, a presença de Si não interfere na análise das amostras, pois as moléculas não absorvem na faixa espectral de interesse.

Embora os SVM contenham magnésio, zinco, cálcio, manganês, cobre, selênio, cobalto e cromo em sua composição e possam conter alguns contaminantes, assim como as amostras GUA e TERMO, a presença destes elementos não interfere na determinação de Fe e Ni, uma vez que não possuem linhas espectrais suficientemente próximas as linhas

selecionadas para os analitos. Assim, a determinação simultânea de Fe e Ni nas linhas de absorção selecionadas para estes elementos é livre de interferências espectrais, como pode ser verificado a partir do espectro de absorção resolvido temporalmente na vizinhança da linha de absorção de Ni em 352,454 nm, como mostra a Figura 21.

Figura 21 - Espectro resolvido no tempo obtido por HR-CS SS-GF AAS na região espectral em  $352,454 \pm 0,2$  nm para 400 pg de Ni e 40 ng de Fe em solução padrão (A) e para as amostras SVM-01 ( $m = 1,535$  mg) (B), GUA-01 ( $m = 0,272$  mg) (C) e TERMO-01 ( $m = 0,370$  mg) (D),  $T_p = 1000$  °C e  $T_a = 2700$  °C.



Fonte: Autora.

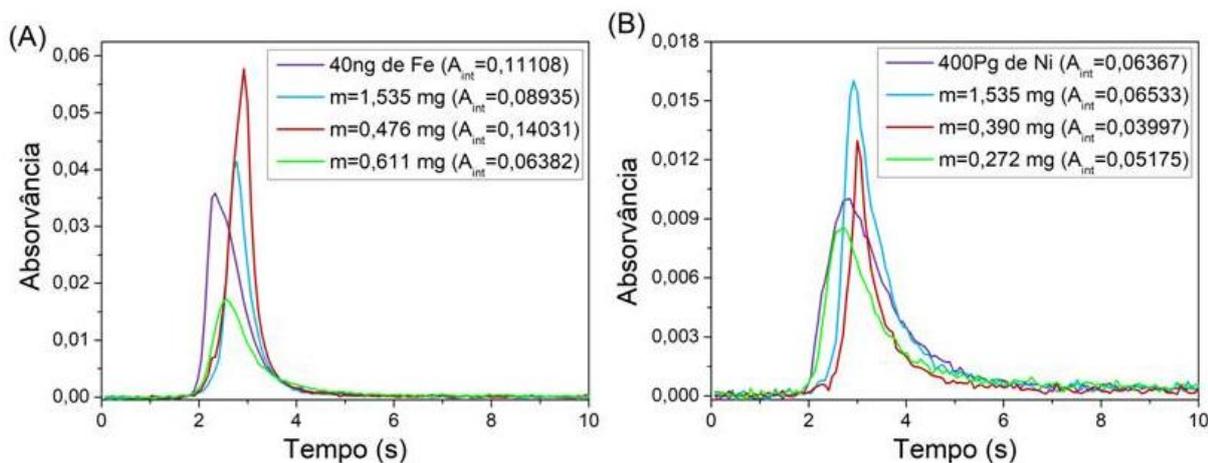
#### 4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ

A avaliação do efeito da matriz sobre o sinal analítico é extremamente importante para escolha da técnica de calibração mais adequada. Diversos estudos compararam os sinais

transientes obtidos para os analitos em solução e nas amostras a fim de avaliar a possibilidade de utilizar padrões aquosos para calibração (BELARRA et al., 2003; DOS SANTOS et al., 2009; GÓMEZ-NIETO et al., 2013; RESANO et al., 2011; RESANO et al., 2013; RESANO; FLÓREZ, 2012; SOARES et al., 2016). Deste modo, o mesmo foi realizado neste trabalho.

Uma vez que a maior parte da matriz das amostras pôde ser decomposta e removida termicamente durante a etapa de pirólise, os sinais analíticos resultantes não devem ser significativamente afetados por interferências da matriz. A Figura 22 mostra a sobreposição dos sinais transientes de Fe e Ni no pixel central para solução padrão e para as amostras. Como pode ser observado, foram obtidos sinais bem definidos e uma linha base estável é alcançada para ambos os analitos. Adicionalmente, o perfil temporal dos sinais analíticos para Fe e Ni nas amostras sólidas é muito semelhante ao obtido para estes elementos em padrão aquoso. Apesar dos sinais dos analitos em solução e na amostra GUA-01 serem ligeiramente mais alargados, enquanto que os obtidos para as amostras SVM-01 e TERMO-01 apresentam uma altura de pico maior, os valores das áreas dos picos obtidos são muito similares, indicando que a calibração externa com soluções padrões é uma alternativa viável.

Figura 22 - Sobreposição dos sinais transientes de Fe (A) e Ni (B) no pixel central para as amostras SVM-01 (—), GUA-01 (—) e TERMO-01 (—) e para solução padrão (—),  $T_p = 1000\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_a = 2700\text{ }^\circ\text{C}$ .



Fonte: Autora.

Outra maneira de avaliar a influência da matriz das amostras sólidas sobre a eficiência da atomização e, conseqüentemente, a possibilidade de utilizar soluções de referência para calibração, é através da comparação da inclinação da curva de calibração contra padrões aquosos com a inclinação da curva obtida pela calibração usando CRM sólido ou pela técnica de adição do analito (DE GOIS et al., 2016; DITTERT et al., 2009; KRAWCZYK, 2014;

RÊGO et al., 2012; VIRGILIO et al., 2012). Devido à indisponibilidade de CRM adequado, optou-se por realizar a técnica de adição do analito, como será discutido mais adiante.

#### 4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FINS COMPARATIVOS

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a análise da amostra SVM-01 por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e os resultados obtidos pela análise das soluções resultantes dos procedimentos de digestão A e B. Os resultados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) com fator único, considerando um intervalo de confiança de 95%, como mostra a Tabela 6.

Tabela 5 - Concentrações de Fe e Ni na amostra SVM-01 determinadas por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) e HNO<sub>3</sub>/HCl (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Procedimento	Fe (ng mg <sup>-1</sup> )	Ni (pg mg <sup>-1</sup> )
SS	20,17 ± 0,88	230,84 ± 15,24
A	21,61 ± 2,10	234,22 ± 6,58
B	18,66 ± 2,35	233,39 ± 39,54

Tabela 6 - ANOVA para os valores de concentração de Fe e Ni na amostra SVM-01.

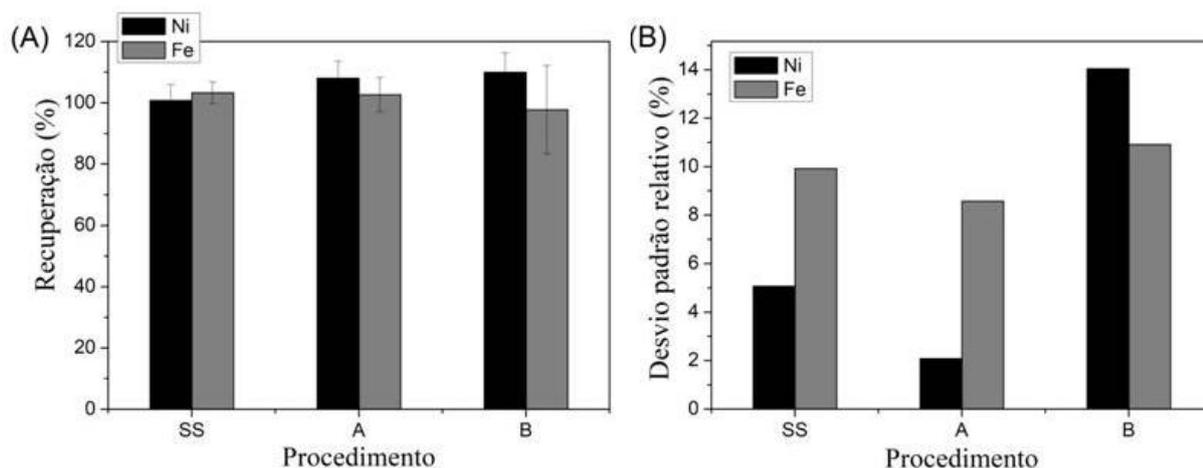
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>cal</sub> <sup>a</sup>	p
<b>Fe</b>					
Tratamento (entre grupos)	13,10	2	6,549	1,831	0,2395
Resíduo (dentro dos grupos)	21,46	6	3,577		
Total	34,56	8			
<b>Ni</b>					
Tratamento (entre grupos)	18,58	2	9,291	0,015	0,9850
Resíduo (dentro dos grupos)	3679	6	613,2		
Total	3698	8			

<sup>a</sup>F<sub>tab</sub> = 5,143

A partir da ANOVA foi possível observar que não há diferença significativa ( $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ ) entre os valores das concentrações de Fe e Ni obtidos pelo método proposto e pelos dois procedimentos empregados, assumindo a equidade entre os valores de desvio padrão.

A eficiência dos procedimentos foi avaliada através do ensaio de recuperação para Fe e Ni. Os resultados obtidos, ilustrados na Figura 23, indicam que os procedimentos são adequados para decomposição da amostra SVM-01, visto que as recuperações para ambos os elementos estão dentro dos limites aceitáveis: entre 75 a 120% ( $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e 85 a 110% ( $100 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (AOAC, 2013). A Figura 23 também ilustra os valores de RSD resultantes de três medidas consecutivas das soluções. Como pode ser observado, ambos os procedimentos apresentaram uma precisão satisfatória, uma vez que os valores estão de acordo com o proposto na literatura (AOAC, 2013).

Figura 23 - Resultados para o teste de recuperação (A) e desvio padrão relativo (B) para determinação de Fe e Ni na amostra SVM-01 por HR-CS GF-AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  (A) e  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  (B).



Fonte: Autora.

Considerando que as melhores condições de recuperação (102,68 e 108,11% para Fe e Ni, respectivamente) e os menores valores de RSD (8,6% para Fe e 2,1% para Ni) foram obtidos com o uso da mistura de reagentes  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ , o procedimento A foi adotado como método de digestão para as demais amostras de suplementos vitamínicos minerais.

As concentrações médias determinadas por HR-CS SS-GF AAS e pelo procedimento A também foram comparadas pelo teste t. Uma vez que o valor de  $t_{\text{calculado}}$  para Fe (0,89) e Ni (0,27) foi menor que  $t_{\text{crítico}} (0,05,2)$  (4,30), não há diferenças significativas entre os resultados

obtidos por ambos os métodos,. Devido à boa concordância com os resultados, a avaliação dos demais procedimentos de digestão para esta amostra foi considerada desnecessária.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para a análise da amostra GUA-01 por HR-CS SS-GF AAS, e os resultados obtidos pela análise das soluções resultantes dos procedimentos de digestão A, B, C e D.

Tabela 7 - Concentrações de Fe e Ni na amostra GUA-01 determinadas por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), HNO<sub>3</sub>/HCl (B), HNO<sub>3</sub>/HCl/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) e HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D). Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Procedimento	Fe (ng mg <sup>-1</sup> )	Ni (ng mg <sup>-1</sup> )
SS	38,62 ± 1,36	1,23 ± 0,10
A	25,37 ± 1,49	1,28 ± 0,18
B	29,87 ± 2,33	1,26 ± 0,01
C	19,56 ± 3,35	1,40 ± 0,14
D	40,23 ± 1,70	1,29 ± 0,07

Como pode ser visto na Tabela 7, o resultado obtido para determinação de Ni pela análise direta da amostra GUA-01 está de acordo com os resultados obtidos pela análise da solução da amostra digerida pelos procedimentos A, B, C e D, com os intervalos de incerteza sobrepostos em todos os casos. A partir da ANOVA (Tabela 8), foi possível observar que não há diferença significativa ( $F_{cal} < F_{tab}$ ) entre os valores da concentração de Ni obtidos pelo método proposto e pelos procedimentos A a D, a um nível de confiança de 95%.

No entanto, a escolha de um método adequado para digestão da amostra visando à determinação de Fe foi ligeiramente mais complexa. A hipótese de igualdade da concentração média de Fe determinada por cada procedimento foi inicialmente testada pelo teste F (ANOVA), como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 – ANOVA para os valores de concentração de Fe e Ni na amostra GUA-01.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F<sub>cal</sub><sup>a</sup></b>	<b>p</b>
<b>Fe</b>					
Tratamento (entre grupos)	912,0	4	228,0	60,28	<0,0001
Resíduo (dentro dos grupos)	37,82	10	3,782		
Total	949,8	14			
<b>Ni</b>					
Tratamento (entre grupos)	49879	4	12470	1,092	0,4117
Resíduo (dentro dos grupos)	114234	10	11423		
Total	164113	14			

<sup>a</sup>F<sub>tab</sub> = 3,478

A partir da ANOVA foi possível observar que pelo menos um dos resultados obtidos para a determinação de Fe difere significativamente dos demais, uma vez que o valor de F<sub>cal</sub> foi maior que F<sub>tab</sub>. Deste modo, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey a fim de comparar o valor médio de Fe obtido pelo método proposto (SS) e pelos demais procedimentos e verificar quais resultados diferem entre si (Tabela 9). A Figura 24 mostra os intervalos de confiança (95%) para a diferença entre as médias dos valores de Fe.

Tabela 9 – Resultados para o teste de comparação múltipla de Tukey.

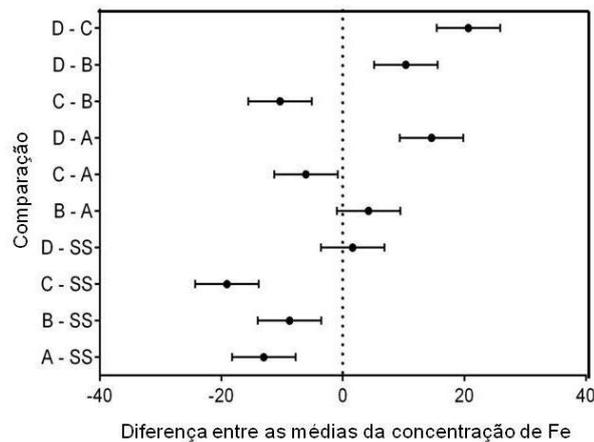
<b>Comparação<sup>a</sup></b>	<b>Diferença entre médias</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>q<sub>cal</sub><sup>b</sup></b>	<b>P</b>
SS-A	12,99	7,76 - 18,2	11,5	<0,0001
SS-B	8,74	3,52 - 13,9	7,79	0,0019
SS-C	19,06	13,8 - 24,2	16,9	<0,0001
SS-D	-1,61	-6,83 - 3,61	1,43	0,8425

<sup>a</sup> Comparações entre os resultados obtidos pelos procedimentos A a D foram omitidas; <sup>b</sup>q<sub>tab</sub> = 4,65.

De acordo com a Tabela 9, há diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto e após a digestão da amostra pelos procedimentos A, B e C, pois o valor de q<sub>cal</sub> é maior que o valor de q<sub>tab</sub>. Na Tabela 7, é possível observar que a concentração de Fe determinada por HR-CS SS-GF AAS é maior do que as concentrações obtidas mediante a aplicação destes procedimentos. Por outro lado, de acordo com o teste de Tukey, não há

diferença significativa entre as médias da concentração de Fe determinada pelo método proposto e pelo procedimento D ( $q_{cal} < q_{tab}$ ). Como pode ser visto na Figura 24, o intervalo de confiança para a diferença entre estas duas médias contém o valor zero.

Figura 24 - Intervalos de confiança (95%) para a diferença entre as médias da concentração de Fe determinada por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), HNO<sub>3</sub>/HCl (B), HNO<sub>3</sub>/HCl/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) e HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D).



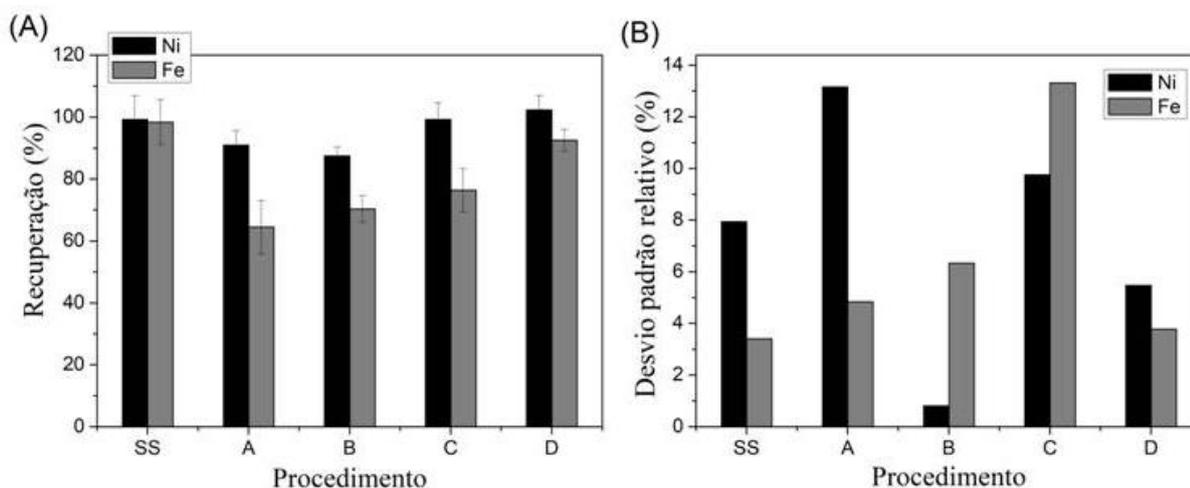
Fonte: Autora.

As causas mais comuns relatadas na literatura para perda dos analitos durante o tratamento da amostra são a perda por volatilização, adsorção, co-precipitação, formação de compostos estáveis bem como a digestão incompleta da amostra (ARRUDA, 2007; HOENIG, 2001; MESTER; STURGEON, 2003). Os procedimentos foram realizados em frascos abertos a pressão ambiente empregando bloco digestor e, neste caso, a temperatura máxima utilizada foi limitada (aproximadamente 100 °C). Uma vez que Fe é um elemento refratário, a esta temperatura é improvável que tenha ocorrido perda por volatilização. Porém, a uma temperatura relativamente baixa, o poder oxidante do ácido nítrico não foi suficiente para obter uma completa decomposição da matriz desta amostra, evidenciado pelo resíduo que permanece após a aplicação dos procedimentos, provavelmente sendo a possível causa do erro observado.

A Figura 25 ilustra os resultados para os testes de recuperação e precisão. Todos os procedimentos apresentaram recuperações quantitativas para Ni, isto é, dentro do intervalo aceitável para este nível de concentração (75-120%) (AOAC, 2013). Logo, os procedimentos são adequados para a solubilização deste elemento a partir da matriz da amostra de guaraná. De forma similar, os valores de RSD obtidos para Ni estão de acordo com a literatura (AOAC, 2013), mostrando que os procedimentos apresentam boa repetitividade. No entanto,

o procedimento C apresentou uma baixa precisão para Fe. Adicionalmente, os baixos valores de recuperação para Fe mediante a aplicação dos procedimentos A, B e C tornam evidente que a amostra de guaraná requer condições de digestão mais fortes para garantir a completa solubilização deste elemento. Frequentemente, baixos valores de recuperação são associados à incompleta decomposição da matriz da amostra e retenção do analito no resíduo insolúvel (HOENIG et al., 1998; MADER; SZÁKOVÁ; MIHOLOVÁ, 1998; OLIVA; RAITIO; MINGORANCE, 2003). Além disso, a filtração da amostra após os procedimentos de mineralização pode ter contribuído para o baixo teor de Fe determinado, uma vez que o analito pode ter ficado parcialmente retido no papel de filtro.

Figura 25 - Resultados para o teste de recuperação (A) e desvio padrão relativo (B) para determinação de Fe e Ni na amostra GUA-01 por HR-CS GF-AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  (A) e  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  (B),  $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$  (C) e  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  (D).



Fonte: Autora.

Mierzwa e colaboradores (1998) avaliaram diferentes procedimentos de digestão assistida por microondas para a determinação de Fe e outros elementos em folhas de chás por ICP OES. Para este propósito, os autores inicialmente testaram  $\text{HNO}_3$  concentrado, porém não foram obtidas recuperações quantitativas e o método foi considerado ineficiente. Deste modo, foram avaliadas três combinações de ácidos,  $\text{HNO}_3/\text{HF}$ ,  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  e  $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{HF}$ . Baixas recuperações para Fe também foram observadas com as misturas  $\text{HNO}_3/\text{HF}$  e  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$ . A mistura  $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{HF}$ , na proporção em volume 9/1/1 mL, foi mais eficiente que as demais e resultou nas melhores recuperações para os analitos, exceto para Fe. Uma melhor recuperação para Fe foi obtida com o uso dos mesmos ácidos na proporção em volume 7,5/2,5/1 mL.

Oliva, Raitio e Mingorance (2003) realizaram a comparação de dois procedimentos de digestão por microondas para a determinação de Fe e outros elementos em amostras de plantas. As amostras foram digeridas com a mistura  $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$  usando um sistema de microondas aberto e com a mistura  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  em um sistema de microondas fechado. Os autores observaram que o procedimento realizado em sistema aberto resultou em um valor 52% menor do que o valor certificado para Fe. A baixa concentração determinada de Fe foi atribuída à incompleta mineralização da matriz da amostra que contém silicatos, devido aos reagentes utilizados na digestão.

De forma similar, Amorim Filho, Polito e Gomes Neto (2007) compararam os resultados obtidos para a determinação de Fe e outros elementos em amostras de café após a decomposição das amostras por digestão por via úmida em sistema aberto (bloco digestor) e sistema fechado (forno de microondas convencional com controle de pressão e temperatura), empregando a mistura de reagentes  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ . Os autores relataram que a digestão em sistema aberto foi ineficiente para a solubilização total de Fe a partir das amostras de café torrado, obtendo-se resultados menores aos obtidos pela digestão em sistema fechado. No entanto, os autores não discutiram qual a influência da matriz da amostra no processo de digestão.

Assim como o café, as sementes de guaraná contêm alta concentração de metilxantinas, principalmente a cafeína (contendo até 6% do peso seco) e polifenóis (DA SILVA et al., 2017; DE SOUSA et al., 2011). Estes compostos possuem atividade quelante e podem formar complexos com metais de transição, incluindo o Fe (item 2.1.3.1) (LIMA et al., 2010; POHL et al., 2013). O teor de cafeína em sementes de guaraná é 4 a 6 vezes maior do que a encontrada em grãos de café e, possivelmente, a forte interação do Fe com a matriz da amostra de guaraná tenha dificultado a completa liberação deste elemento para solução com a aplicação dos procedimentos A, B e C. A utilização do procedimento D resultou em uma melhora na eficiência da decomposição da amostra GUA-01, atribuída à combinação do ácido sulfúrico com os demais reagentes, visto que o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  também apresenta elevado poder oxidante. Neste caso, a recuperação foi de 92,6% para Fe e 102,3% para Ni. Estes resultados confirmam a conclusão anterior relativa à retenção do Fe devido à incompleta decomposição da amostra pelos métodos A a C. Cabe salientar que, conforme relatado na literatura, a mistura  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  também já foi empregada com sucesso para a digestão de amostras de café (MARTIN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1998; MARTIN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1999) e de plantas (MOMEN et al., 2008) em sistema aberto.

De acordo com o teste t, os resultados obtidos para a determinação simultânea de Fe e Ni pelo método proposto apresentam boa concordância com os resultados obtidos pela análise da amostra digerida pelo procedimento D, visto que  $t_{\text{calculado}}$  para Fe (0,99) e Ni (1,25) são menores que  $t_{\text{crítico}} (0,05, 2)$  (4,30). Nestas condições, os valores de RSD para Fe e Ni foram, respectivamente, 3,78 e 5,47%. Deste modo, o procedimento D foi adotado como método de digestão para as demais amostras de guaraná.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos para a análise da amostra TERMO-01 por HR-CS SS-GF AAS e os resultados obtidos pela análise das soluções resultantes dos procedimentos de digestão A, B, C e D.

Tabela 10 - Concentrações de Fe e Ni na amostra TERMO-01 determinadas por HR-CS GF AAS com amostragem sólida (SS) e após a digestão da amostra com as misturas  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  (A),  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  (B),  $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$  (C) e  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  (D). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

Procedimento	Fe ( $\text{ng mg}^{-1}$ )	Ni ( $\text{ng mg}^{-1}$ )
SS	109,07 $\pm$ 6,08	0,57 $\pm$ 0,03
A	10,73 $\pm$ 1,27	0,36 $\pm$ 0,10
B	Nd	0,25 $\pm$ 0,01
C	9,06 $\pm$ 1,59	0,31 $\pm$ 0,03
D	12,31 $\pm$ 2,48	0,55 $\pm$ 0,04

Nd = Não detectado.

A amostra TERMO-01, um termogênico à base de cafeína, fornece 420 mg de cafeína por dose. Obviamente, o teor de cafeína nesta amostra é muito mais elevado do que o encontrado na amostra de guaraná. Logo, como já era esperado, os procedimentos de digestão avaliados foram ineficientes para obter uma completa decomposição da matriz da amostra, evidenciado pelo resíduo que permanece após a aplicação dos procedimentos.

A ANOVA (Tabela 11) mostrou que existe diferença significativa ( $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ ) entre os resultados obtidos para a determinação de Fe e Ni na amostra TERMO-01, a um nível de confiança de 95%. De acordo com o teste de Tukey (Tabela 12), os valores da concentração de Ni determinados pelos métodos SS e D são concordantes entre si ( $q_{\text{cal}} < q_{\text{tab}}$ ), e diferem significativamente dos resultados obtidos pelos métodos A, B e C. Segundo o teste t, a concentração deste elemento determinada pelo método proposto está de acordo com a concentração determinada na solução da amostra resultante do procedimento D, uma vez que  $t_{\text{calculado}}$  (1,15) é menor que  $t_{\text{crítico}} (0,05, 2)$  (4,30).

No entanto, o mesmo não foi observado para a determinação de Fe nesta amostra. De acordo com o teste de Tukey (Tabela 12), o resultado obtido pelo método proposto difere significativamente da concentração determinada pelos procedimentos A a D.

Tabela 11 - ANOVA para os valores de concentração de Fe e Ni na amostra TERMO-01.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F<sub>cal</sub><sup>a</sup></b>	<b>P</b>
<b>Fe</b>					
Tratamento (entre grupos)	24844,7	4	6211,18	741,3	<0,0001
Resíduo (dentro dos grupos)	83,7874	10	8,37874		
Total	24928,5	14			
<b>Ni</b>					
Tratamento (entre grupos)	237031	4	59257,9	21,07	<0,0001
Resíduo (dentro dos grupos)	28115,1	10	2811,51		
Total	265147	14			

<sup>a</sup>F<sub>tab</sub> = 3,478

Tabela 12 - Resultados para o teste de comparação múltipla de Tukey.

<b>Comparação<sup>a</sup></b>	<b>Diferença entre médias</b>	<b>Intervalo de confiança (95%)</b>	<b>q<sub>cal</sub><sup>b</sup></b>	<b>P</b>
<b>Fe</b>				
SS-A	98,95	91,17 – 106,7	59,2	<0,0001
SS-B	109,0	101,2 – 116,8	65,2	<0,0001
SS-C	100,0	92,23 – 107,7	59,8	<0,0001
SS-D	96,76	88,98 – 104,5	57,9	<0,0001
<b>Ni</b>				
SS-A	212,3	70,29 – 355,2	6,95	0,0042
SS-B	323,3	180,8 – 465,8	10,5	0,0001
SS-C	259,8	117,3 – 402,2	8,48	0,0009
SS-D	40,60	-101,8 – 183,0	1,32	0,8757

<sup>a</sup> Comparações entre os resultados obtidos pelos procedimentos A a D foram omitidas; <sup>b</sup> q<sub>tab</sub> = 4,65

Os baixos valores de recuperação obtidos para Fe e Ni mediante a aplicação dos procedimentos A a C corroboram com o que foi anteriormente observado durante a

comparação dos procedimentos, isto é, que há perda dos analitos devido à retenção dos mesmos ocasionada pela baixa eficiência dos procedimentos de digestão avaliados. Logo, a amostra TERMO-01 requer condições de digestão mais fortes para garantir a completa solubilização de Fe e Ni. De fato, a utilização do procedimento D resultou em uma melhora na eficiência da decomposição da amostra TERMO-01 em relação à determinação de Ni, obtendo-se uma recuperação de 102,3% para este elemento. Este procedimento também apresentou uma boa precisão para a determinação de Ni, visto que o RSD foi de 4,94%. No entanto, a recuperação obtida para Fe foi de apenas 60,39%. Deste modo, uma vez que nenhum dos procedimentos testados foram adequados para a determinação de Fe a partir decomposição da amostra TERMO-01, a comparação dos resultados para a determinação deste analito em solução na ausência da matriz com o obtido pelo método proposto não foi possível.

Vale ressaltar que em procedimentos de digestão por via úmida, a amostra é necessariamente diluída. Neste caso, o volume de diluição apropriado depende da concentração dos analitos na amostra bem como da sensibilidade do método de análise. A baixa concentração de Fe e Ni nas amostras foi um fator limitante para o volume da diluição final. Como consequência, independente do procedimento de digestão aplicado, a acidez das soluções resultantes contribuiu para uma rápida deterioração do forno de grafite, diminuindo significativamente a vida útil do mesmo.

#### 4.8 CALIBRAÇÃO E FIGURAS DE MÉRITO

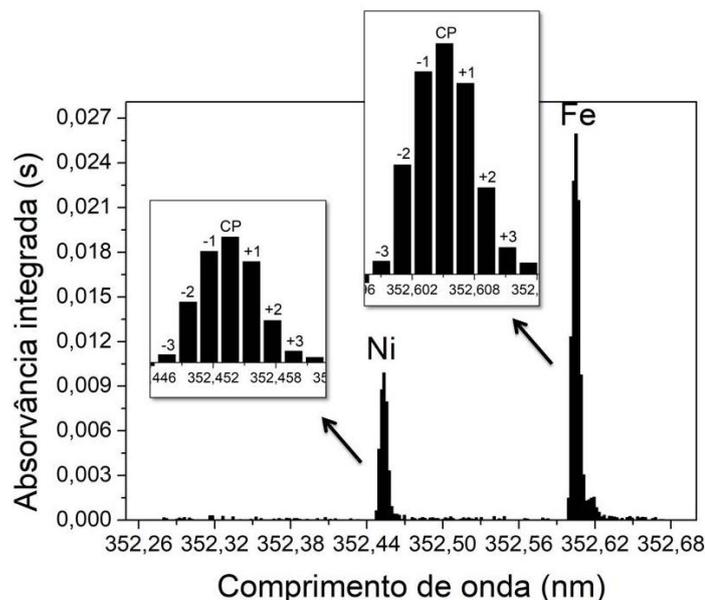
A técnica de HR-CS AAS permite a seleção do número adequado de pixels do detector para quantificar o sinal (RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014; WELZ et al., 2010b; WELZ et al., 2014). Como cada pixel de um arranjo CCD atua como um detector individual e independente, é possível somar os valores de absorvância integrada medidos em mais de um pixel para obter a absorvância selecionada do volume de pico (PVSA) (HEITMANN et al., 2007; WELZ et al., 2010a; WELZ et al., 2010b). Assim, a sensibilidade pode ser melhorada com o aumento do número de pixels usados para a quantificação do sinal analítico, ou seja, utilizando o pixel central mais pixels adjacentes, pois, obviamente, quando mais pixels são selecionados para calcular a PVSA uma maior sensibilidade pode ser obtida (HEITMANN et al., 2007; WELZ et al., 2010a; WELZ et al., 2010b ; WELZ et al., 2014).

Contudo, a aplicação desta estratégia depende do perfil do pico, pois cada pixel também contribui para o nível de ruído e esta contribuição reflete nos valores de LOD.

Quando muitos pixels são selecionados, o ligeiro aumento da sensibilidade não pode compensar o aumento do ruído e, como consequência, obtêm-se limites de detecção piores (HEITMANN et al., 2007; RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014; WELZ et al., 2010a; WELZ et al., 2010b).

A Figura 26 mostra o perfil segmentado das linhas de absorção de Ni em 352,454 nm e Fe em 352,604 nm, de forma que a porção do sinal monitorado por cada pixel individual do detector possa ser avaliada. Como pode ser observado na Figura 26, os pixels centrais (pixel 89 para Ni e pixel 164 para Fe) medem a absorvância apenas do centro das linhas de Fe e Ni, enquanto a largura total de ambas as linhas de absorção se estende por cerca de 7 pixels. No entanto, para obter uma melhor sensibilidade e limites de detecção mais baixos, apenas os pixels centrais mais sensíveis devem ser usados. Deste modo, a PVSA foi obtida a partir da soma dos valores de absorvância integrada do pixel central mais dois pixels adjacentes ( $CP \pm 1$ ) e do pixel central mais quatro pixels adjacentes ( $CP \pm 2$ ) tanto para Fe quanto para Ni. A inclusão dos pixels mais distantes do CP ( $\pm 3$ ) resultaria em uma contribuição insignificante para a PVSA devido à proximidade com a linha de base em ambos os casos e, por este motivo, estes pixels não foram avaliados.

Figura 26 - Perfil segmentado das linhas de absorção obtidas para 400 pg de Ni e 40 ng de Fe em solução em 352,454 nm para Ni e 352,604 nm para Fe.



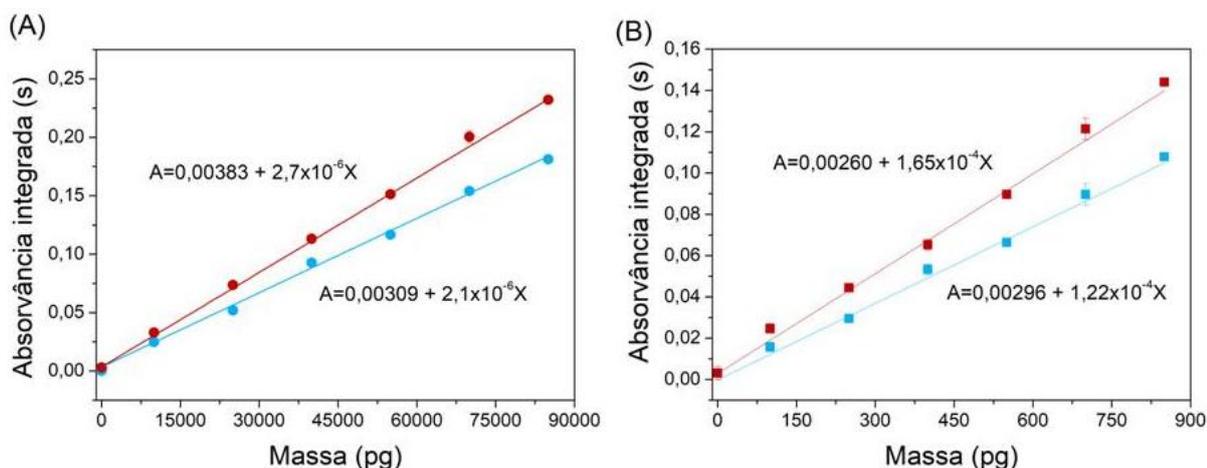
Fonte: Autora.

Após estabelecidas as condições ótimas de trabalho, explorou-se a possibilidade de quantificação com curvas de calibração construídas com soluções aquosas. As curvas de

calibração para Fe e Ni foram obtidas simultaneamente usando seis soluções padrões com concentrações entre 0,5 e 4,25 mg L<sup>-1</sup> para Fe (correspondente a 10 a 85 ng de Fe) e 5,0 e 42,5 µg L<sup>-1</sup> para Ni (correspondente a 100 a 850 pg de Ni). Com a utilização de 3 pixels, as funções de calibração para Fe e Ni foram, respectivamente,  $y = 0,00309 + 2,1 \times 10^{-6}x$  (R=0,998) e  $y = 0,00296 + 1,22 \times 10^{-4}x$  (R=0,997), enquanto a utilização de 5 pixels resultou nas funções de calibração de  $y = 0,00383 + 2,7 \times 10^{-6}x$  (R=0,999) para Fe e  $y = 0,00260 + 1,65 \times 10^{-4}x$  (R=0,997) para Ni, onde y é o sinal analítico e x é a massa do analito expressa em pg. Os gráficos de regressão linear são mostrados na Figura 27.

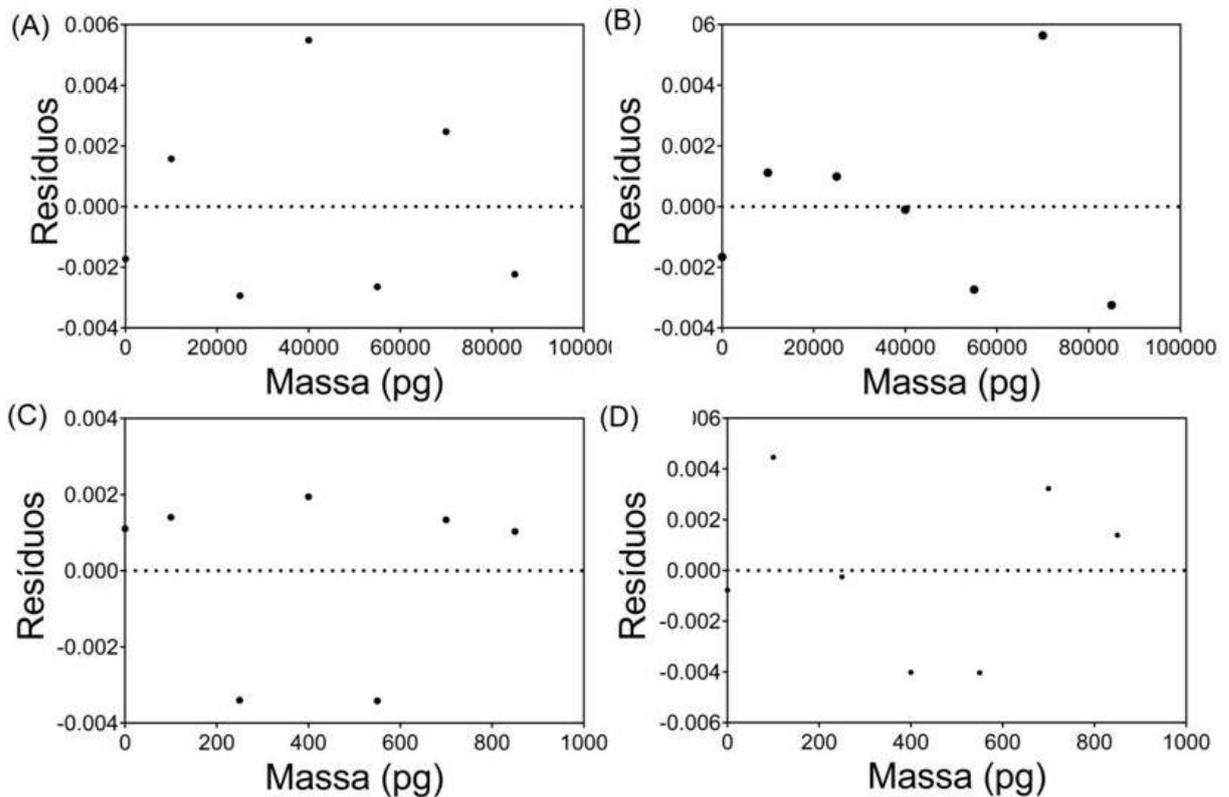
Os resíduos da regressão foram calculados através da diferença entre os valores de absorvância medidos e os valores de absorvância calculados pela reta ajustada. Estes dados foram utilizados para construção do gráfico dos resíduos como uma função da massa dos analitos (Fig. 28), conforme recomendado pela AOAC (2013).

Figura 27 - Curvas de calibração obtidas para Fe em 352,604 nm (A) e Ni em 352,454 nm (B), utilizando CP ± 1 (—) e CP ± 2 (—), T<sub>p</sub> = 1000 °C e T<sub>a</sub> = 2700 °C (n=3).



Fonte: Autora.

Figura 28 – Gráfico do perfil dos resíduos das regressões para Fe utilizando CP  $\pm$  1 (A) e CP  $\pm$  2 (B) e para Ni utilizando CP $\pm$ 1 (C) e CP $\pm$ 2 (D).



Fonte: Autora.

Como pode ser visto na Figura 27, todos os pontos estão dispostos muito próximos das respectivas retas ajustadas, indicando a linearidade do método dentro da faixa de concentração avaliada. Esta observação pode ser confirmada pelos gráficos dos resíduos, os quais mostram uma distribuição aleatória em torno da linha reta em todos os casos.

A linearidade do método também foi avaliada a partir do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da reta ajustada ao modelo e a ANOVA foi utilizada para verificar a significância da regressão através do Teste F (nível de confiança de 95%). Os testes de Shapiro Wilk e Brown-Forsythe também foram utilizados para verificar, respectivamente, a normalidade e homocedasticidade dos resíduos, conforme recomendado pelo INMETRO (2011). Os resultados estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente às curvas de calibração para Fe e Ni.

	Fe		Ni	
	CP ± 1	CP ± 2	CP ± 1	CP ± 2
<b>Teste de Shapiro Wilk<sup>a</sup></b>				
$W_{\text{calc}}$	0,864	0,914	0,930	0,929
P	0,165	0,424	0,142	0,550
<b>Teste de Brown-Forsythe<sup>b</sup></b>				
$F_{\text{BF-calc}}$	1,306	0,813	1,109	0,674
P	0,317	0,576	0,405	0,672
<b>Regressão<sup>c</sup></b>				
$F_{\text{reg-calc}}$	2151	3944	3834	1199
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>Coefficiente de determinação</b>	0,997	0,998	0,995	0,995

<sup>a</sup> $W_{\text{tab}} = 0,803$ ; <sup>b</sup> $F_{\text{BF-tab}} = 2,848$ ; <sup>c</sup> $F_{\text{reg-tab}} = 6,608$ .

De acordo com os dados apresentados na Tabela 13 para o teste de Shapiro Wilk, é possível verificar que os resíduos apresentam uma distribuição normal a um nível de confiança de 95%, uma vez que os valores de  $W_{\text{calc}}$  foram maiores que os valores de  $W_{\text{tab}}$  em todos os casos. Conforme os resultados obtidos para o teste de Brown-Forsythe, verificou-se que não há diferença significativa nas variâncias dos resíduos, pois os valores de  $F_{\text{BF-calc}}$  foram menores que  $F_{\text{BF-tab}}$ .

A partir da análise de regressão, observou-se que as curvas apresentam significativa linearidade a um nível de confiança de 95%, uma vez que os valores de  $F_{\text{reg-calc}}$  foram maiores que  $F_{\text{reg-tab}}$  e os valores de p foram menores que 0,05. A qualidade do ajuste do modelo foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os valores de  $R^2$  obtidos foram maiores que 0,99, indicando que mais de 99% da variabilidade dos dados é explicada pela regressão, ou seja, confirmando que o modelo é adequado (NETO BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

As figuras de mérito, determinadas usando CP ± 1 e CP ± 2, estão resumidas na Tabela 14. O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados como três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de 10 medidas do branco dividido pela inclinação das curvas de calibração (NATA, 2012). As leituras do branco foram feitas de acordo com a

técnica “massa zero”, que consiste na introdução da plataforma vazia no forno de grafite aplicando o mesmo programa de temperatura usado nas análises (Tabela 2). Ambos os limites foram calculados para a massa máxima de amostra utilizada neste trabalho (2,8 mg).

A massa característica ( $m_0$ ) é definida como a massa do analito que produz uma PVSA de 0,0044 s. Com a utilização de 3 pixels, a  $m_0$  encontrada para Fe foi 2053 pg e para Ni foi 36 pg. Estes valores estão de acordo com os relatados na literatura (RESANO et al., 2011). Com a utilização de 5 pixels, as massas características para Fe e Ni foram, respectivamente, 1597 pg e 27 pg. No entanto, não foram encontrados na literatura valores das massas características para estes elementos obtidos nestas condições.

Tabela 14 - Figuras de mérito para a determinação simultânea de Fe e Ni por HR-CS SS-GF AAS.

Parâmetro	Fe		Ni	
	CP ± 1	CP ± 2	CP ± 1	CP ± 2
Faixa linear (ng)	10 – 85	10 – 85	0,10 – 0,85	0,10 – 0,85
Inclinação (s pg <sup>-1</sup> )	2,14 x 10 <sup>-6</sup>	2,71 x 10 <sup>-6</sup>	1,22 x 10 <sup>-4</sup>	1,65 x 10 <sup>-4</sup>
R	0,998	0,997	0,999	0,997
$m_0$ (pg)	2053	1597	36	27
LOD (pg)/(ng g <sup>-1</sup> )	1738/ 621	1439/ 514	35/ 13	32/ 11
LOQ (pg)/(ng g <sup>-1</sup> )	5215/ 1862	4316/ 1541	105/ 37	96/ 34
RSD (%)	0,5 – 5,5	0,8 - 5,2	0,6 - 4,9	0,8 – 9,2

Como pode ser visto na Tabela 14, melhores sensibilidades e limites de detecção mais baixos foram obtidos para ambos os analitos com o aumento do número de pixels usados para a integração do sinal analítico de 3 para 5 pixels. Assim, a PVSA, obtida a partir da soma dos valores de absorvância integrada do pixel central mais quatro pixels adjacentes (CP ± 2) foi usada como sinal analítico para quantificação de Fe e Ni. Nestas condições, a faixa de trabalho do método variou de 100 a 850 pg para Ni e 10 a 85 ng para Fe em solução.

Para avaliação do efeito da matriz das amostras, as curvas de calibração para Fe e Ni também foram obtidas pela técnica de adição do analito. Inicialmente, as amostras foram analisadas sem a adição dos analitos. Posteriormente, quantidades crescentes dos analitos (5 ng a 10 ng de Fe e 50 pg a 100 pg de Ni) em solução padrão foram adicionadas sobre a massa de amostra previamente pesada na plataforma para a amostragem sólida. As medidas foram

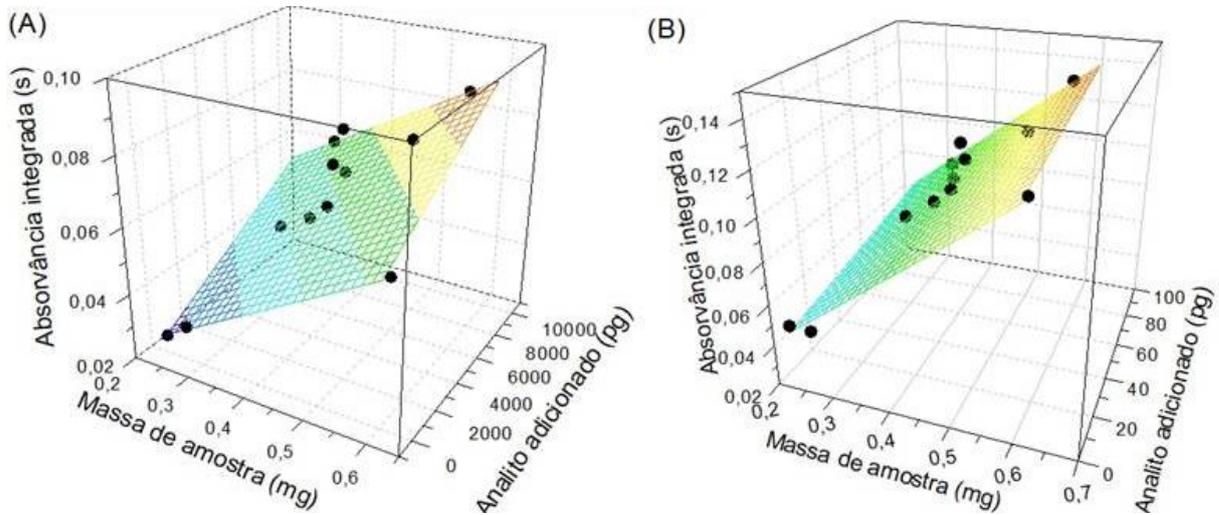
realizadas em triplicata, totalizando doze pontos de dados (para cada amostra) distribuídos nos quatro níveis de concentração, um sem a adição dos analitos e três com adições de padrão.

Os valores de RSD obtidos, considerando a massa de amostra normalizada, foram comparados com os valores calculados ( $RSD_{cal}$ ), de acordo com as diretrizes da AOAC (2013) (item 3.5.3). Como resultado, obteve-se valores aceitáveis para Fe e Ni nas amostras SVM-01 e TERMO-01, indicando uma boa precisão para o procedimento aplicado. No entanto, o mesmo não foi observado para a amostra GUA-01, uma vez que foram obtidos valores de RSD superiores aos valores aceitáveis, tanto para Fe quanto para Ni.

Um estudo encontrado na literatura relatou que os resultados obtidos pela adição de padrão aquoso à amostra sólida diferiram dos obtidos pela análise do analito sem a presença da matriz. Os autores atribuíram este erro ao fato do analito estar em diferentes fases no padrão e na amostra ao mesmo tempo. O problema pôde ser corrigido adicionando-se primeiro o analito em solução padrão à plataforma vazia e, após a aplicação de uma etapa de secagem, a amostra foi pesada na plataforma e submetida ao programa de aquecimento (COŞKUN; AKMAN, 2004). Este procedimento também foi realizado no presente trabalho, resultando em valores de RSD mais baixos para Fe e Ni na amostra GUA-01.

A relação da absorvância com as duas variáveis independentes (massa de amostra e quantidade de analito adicionada) foi obtida através da análise de regressão linear múltipla, resultando em uma superfície de resposta bidimensional em um espaço tridimensional. A Figura 29 mostra as curvas de calibração obtidas pela técnica de adição do analito para Fe e Ni na amostra GUA-01, onde os círculos preenchidos representam os dados experimentais na superfície plana ajustada para Fe ( $R^2 = 0,994$ ) e Ni ( $R^2 = 0,983$ ). Resultados similares foram obtidos para as amostras SVM-01 e TERMO-01. A Tabela 15 apresenta as sensibilidades das curvas para cada amostra, assim como a diferença percentual da sensibilidade entre as curvas obtidas pela técnica de adição do analito e a curva de calibração contra soluções padrões.

Figura 29 – Curvas de calibração obtidas pela técnica de adição do analito para Fe (A) e Ni (B) na amostra GUA-01. Os círculos preenchidos representam os dados experimentais na superfície plana ajustada para Fe ( $R^2 = 0,9943$ ) e Ni ( $R^2 = 0,9834$ ).



Fonte: Autora.

Tabela 15 - Inclinações das curvas de calibração para Fe e Ni nas amostras SVM-01, GUA-01 e TERMO-01 obtidas pela técnica de adição do analito.

Amostra	Sensibilidade (s $\text{pg}^{-1}$ )	
	Fe	Ni
SVM-01	$2,75 \times 10^{-6}$ (+1,47%) <sup>a</sup>	$1,62 \times 10^{-4}$ (-1,81%)
GUA-01	$2,96 \times 10^{-6}$ (+9,22%)	$1,58 \times 10^{-4}$ (-4,24%)
TERMO-01	$2,71 \times 10^{-6}$ (0,00%)	$1,61 \times 10^{-4}$ (-2,42%)

<sup>a</sup> Diferença percentual de sensibilidade entre as curvas obtidas pela técnica de adição do analito e as curvas contra padrões aquosos.

De acordo com a NATA (2012), quando as inclinações não são significativamente diferentes (<10%), não há necessidade de compensar efeitos da matriz. Como pode ser visto na Tabela 15, as inclinações das curvas de calibração externa por padrão aquoso são muito similares às obtidas pela técnica de adição de analito, indicando que não há interferência da matriz das amostras sobre o processo de atomização de Fe e Ni. Isto confirma que a calibração do método pode ser realizada a partir de soluções padrões.

#### 4.9 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade das análises em triplicata das amostras, considerando os valores de absorvância normalizada, e das soluções padrões, e expressa como desvio padrão relativo (RSD) de cada conjunto de medidas. A Tabela 16 apresenta os RSDs obtidos para as amostras e para as soluções padrões, além dos valores calculados ( $RSD_{calc}$ ) de acordo com o proposto pela AOAC (2013). Valores aceitáveis para precisão (expressa como RSD) não devem ultrapassar duas vezes os valores calculados (AOAC, 2013). Como pode ser visto na Tabela 16, a razão entre os valores obtidos e calculados foi inferior a dois em todos os casos, mostrando que o método proposto possui uma boa repetitividade.

Tabela 16 - Desvio padrão relativo para a determinação simultânea de Fe e Ni por HR-CS SS-GF AAS (n =3).

Amostra	RSD (%)		RSD <sub>calc</sub> (%)		RSD / RSD <sub>calc</sub>	
	Fe	Ni	Fe	Ni	Fe	Ni
SVM-01	4,37	6,60	5,07	9,92	0,86	0,66
GUA-01	3,53	8,05	4,60	7,71	0,76	1,04
TERMO-01	5,57	5,83	3,93	8,65	1,41	0,67
<i>Solução padrão</i>						
Fe (0,5 mg L <sup>-1</sup> ) e Ni (5,0 µg L <sup>-1</sup> )	5,20	9,21	8,83	17,62	0,58	0,52
Fe (4,25 mg L <sup>-1</sup> ) e Ni (42,5 µg L <sup>-1</sup> )	1,33	4,31	6,40	12,78	0,20	0,33

$RSD_{calc}$  (%) =  $2C^{-0,15}$ , onde C é a concentração expressa como uma fração de massa.

Devido à indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão do método foi avaliada através do ensaio de adição e recuperação dos analitos, no qual a matriz das amostras foi enriquecida com concentrações conhecidas dos elementos. Os resultados estão apresentados na Tabela 17. As recuperações variaram de 91,2 a 106,3% para Fe e 75,9 a 111,7% para Ni quando as amostras foram fortificadas com 5, 7,5 e 10 ng de Fe e 50, 75 e 100 pg de Ni em solução e medidas pelo método proposto. Estes valores foram considerados satisfatórios para validação do método, uma vez que estão dentro dos intervalos aceitáveis para estes níveis de concentração (AOAC, 2013).

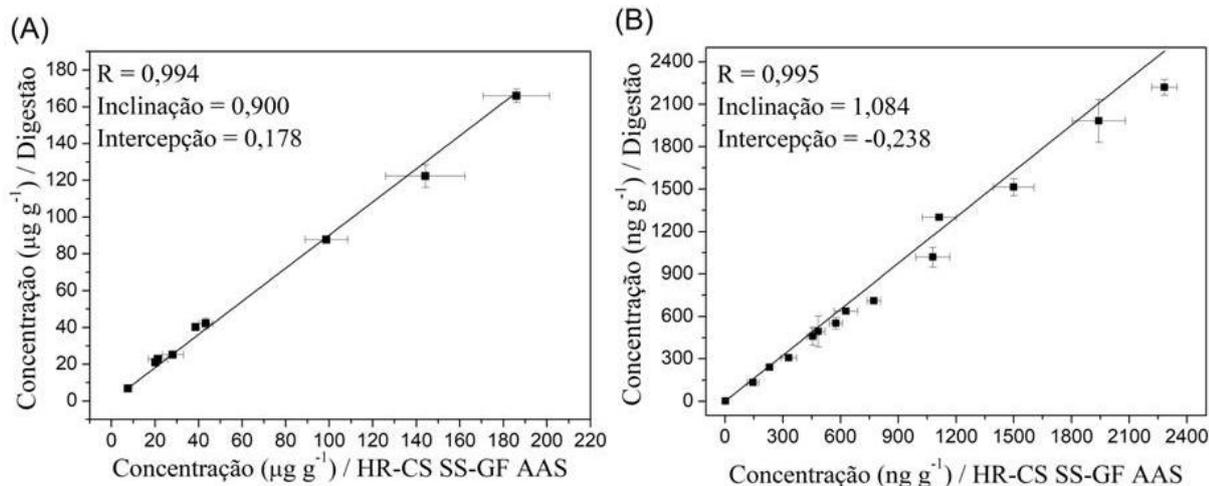
Tabela 17 - Resultados obtidos para os testes de adição e recuperação de Fe e Ni nas amostras SVM-01, GUA-01 e TERMO-01, após adição de 5, 7,5 e 10 ng de Fe e 50, 75 e 100 pg de Ni em solução. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

Amostra	Adicionado		Resultado		Recuperação (%) <sup>a</sup>	
	Fe (ng)	Ni (pg)	Fe (ng)	Ni (pg)	Fe	Ni
SVM-01	0	0	20,17 $\pm$ 0,88	230,8 $\pm$ 15,2	-	-
	5	50	25,40 $\pm$ 1,23	284,6 $\pm$ 15,5	104,4	107,6
	7,5	75	27,30 $\pm$ 0,42	314,6 $\pm$ 7,31	94,9	111,7
	10	100	30,71 $\pm$ 1,02	341,3 $\pm$ 37,4	105,3	110,5
GUA-01	0	0	38,62 $\pm$ 1,36	1233 $\pm$ 99,2	-	-
	5	50	43,52 $\pm$ 0,28	1286 $\pm$ 3,88	98,0	106,0
	7,5	75	46,59 $\pm$ 0,74	1296 $\pm$ 6,82	106,3	84,0
	10	100	49,24 $\pm$ 0,95	1329 $\pm$ 28,8	106,2	96,0
TERMO-01	0	0	109,07 $\pm$ 6,08	575,3 $\pm$ 33,5	-	-
	5	50	113,99 $\pm$ 0,50	619,3 $\pm$ 22,5	98,4	88,1
	7,5	75	115,91 $\pm$ 0,54	632,2 $\pm$ 27,1	91,2	75,9
	10	100	119,14 $\pm$ 0,63	651,2 $\pm$ 17,4	100,7	75,9

<sup>a</sup> Intervalo de recuperação aceitável: 75-120% (1,00  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e 85-110% (100  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (AOAC, 2013).

A exatidão do método também foi avaliada estatisticamente através do método dos mínimos quadrados, plotando-se as concentrações dos analitos determinadas pelo método proposto contra as concentrações determinadas após a digestão das amostras. A análise de regressão (Fig. 30) mostrou que os resultados obtidos para Fe e Ni por HR-CS SS-GF AAS e após a digestão das amostras são equivalentes, pois os valores da inclinação e interceptação em ambos os casos não diferem significativamente de 1 e 0, respectivamente (ADOLFO et al., 2016).

Figura 30 - Análise de regressão de Fe (A) e Ni (B) determinados em amostras de suplementos alimentares por HR-CS SS-GF AAS e após a digestão das amostras por via úmida (n = 3).



Fonte: Autora.

#### 4.10 APLICAÇÃO ANALÍTICA

O método proposto foi aplicado para a determinação simultânea de Fe e Ni em 15 amostras de suplementos alimentares, das quais sete são suplementos vitamínicos minerais, cinco são amostras de guaraná e três são amostras de termogênicos à base de cafeína. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 18 e, de acordo com o teste t, não apresentam diferença significativa comparado aos valores obtidos após a digestão das amostras, a um nível de confiança de 95%.

Tabela 18 - Resultados obtidos para a determinação simultânea de Fe e Ni em amostras de suplementos alimentares por HR-CS GF AAS com amostragem sólida e após a digestão das amostras. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

Amostra	HR-CS SS-GF AAS		Digestão por via úmida		Teste t	
	Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Ni ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Ni ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Fe	Ni
SVM-01	20,17 $\pm$ 0,89	0,23 $\pm$ 0,01	21,04 $\pm$ 2,04	0,24 $\pm$ 0,00	0,89	0,27
SVM-02	7,55 $\pm$ 0,89	0,33 $\pm$ 0,04	6,71 $\pm$ 0,47	0,30 $\pm$ 0,01	1,14	0,85
SVM-03	98,69 $\pm$ 9,79	1,11 $\pm$ 0,09	87,70 $\pm$ 1,27	1,30 $\pm$ 0,01	1,72	3,59
SVM-04	Nd	0,63 $\pm$ 0,06	<LOQ	0,64 $\pm$ 0,02	-	0,30
SVM-05	Nd	Nd	<LOQ	<LOQ	-	-

SVM-06	28,10 ± 4,79	0,77 ± 0,03	25,14 ± 0,21	0,71 ± 0,02	1,03	2,16
SVM-07	Nd	0,14 ± 0,03	<LOQ	0,13 ± 0,02	-	0,51
GUA-01	38,62 ± 1,36	1,23 ± 0,09	40,18 ± 0,80	1,29 ± 0,07	0,99	1,25
GUA-02	185,95 ± 15,17	2,28 ± 0,06	165,93 ± 3,65	2,22 ± 0,05	2,10	1,35
GUA-03	21,32 ± 4,34	0,46 ± 0,03	22,85 ± 1,78	0,46 ± 0,06	1,01	0,06
GUA-04	144,19 ± 18,20	1,94 ± 0,14	122,33 ± 6,13	1,98 ± 0,15	2,04	0,28
GUA-05	43,30 ± 3,11	1,49 ± 0,10	42,18 ± 2,76	1,51 ± 0,06	0,40	0,14
TERMO-01	109,07 ± 6,08	0,57 ± 0,03	-	0,55 ± 0,04	-	1,15
TERMO-02	26,43 ± 2,65	1,08 ± 0,09	-	1,02 ± 0,07	-	0,74
TERMO-03	91,05 ± 3,24	0,48 ± 0,03	-	0,49 ± 0,11	-	0,10

Nd = Não detectado; <LOQ = menor que o limite de quantificação;  $t_{\text{crítico}}(0,05, 2)$  (4,30).

A concentração de Ni encontrada nas amostras de SVM investigadas variou de 0,14 a 1,11  $\mu\text{g g}^{-1}$ , enquanto a concentração de Fe variou de 7,55 a 98,69  $\mu\text{g g}^{-1}$ , exceto para as amostras SVM-04, SVM-05 e SVM-07 nas quais não foi detectado Fe. O Fe frequentemente é adicionado como ingrediente na formulação de muitos suplementos vitamínicos minerais e, por este motivo, diversos trabalhos encontrados na literatura comparam a concentração determinada de Fe com a concentração declarada pelos fabricantes nos rótulos (FRENTIU et al., 2012; KREJČOVÁ et al., 2006; SORIANO; NETTO; CASSELLA, 2007a; SORIANO; NETTO; CASSELLA, 2007b; UDOUSORO; IKEM; AKINBO, 2017). No entanto, nem todos os SVM possuem este elemento em sua composição, como é o caso das amostras analisadas neste trabalho. Neste caso, o Fe pode ser considerado um contaminante. Do mesmo modo, Korfali, Hawi e Mroueh (2013) analisaram diferentes amostras de suplementos alimentares contendo apenas vitaminas ou minerais bem como a associação de ambos. A concentração de Fe nos suplementos vitamínicos variou de 346 a 1836  $\mu\text{g g}^{-1}$ , enquanto nos suplementos contendo apenas minerais e nos suplementos SVM foi de 6 a 82  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 35 a 1349  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

Marrero e colaboradores (2013) analisaram cinco amostras de suplementos alimentares, dentre elas uma amostra de SVM cuja concentração de Ni determinada foi de 10,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Em outro estudo, a concentração de Ni em amostras de SVM variou de 5,7 a 8,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  (KREJČOVÁ et al., 2006). Zachariadis e Olympiou (2008) analisaram cinco amostras de SVM. A concentração de Ni determinada em uma das amostras foi de 14,4  $\mu\text{g g}^{-1}$ , nas demais não foi detectado níquel.

As concentrações de Fe e Ni determinadas para as amostras de guaraná analisadas neste trabalho variaram de 21,32 a 144,19  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 0,46 a 2,28  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Enquanto que para as amostras de termogênicos a base de cafeína a concentração de Fe variou de 26,43 a 109,07  $\mu\text{g g}^{-1}$  e a concentração de Ni variou de 0,48 a 1,08  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Estes valores são comparáveis aos encontrados por Gois e colaboradores (2016), em um estudo no qual os autores analisaram oito amostras de guaraná e uma de café. A concentração de Ni nas amostras de guaraná variou de 1,58 a 3,57  $\mu\text{g g}^{-1}$  e na amostra de café o valor encontrado foi de 0,32  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Estes valores também estão de acordo com os encontrados em amostras de termogênicos, para as quais a concentração de Fe variou de 26,6 a 107  $\mu\text{g g}^{-1}$  e a concentração de Ni variou de 1,28 a 3,28  $\mu\text{g g}^{-1}$  (SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2014a) e em amostras de sementes de guaraná, para as quais a concentração de Fe variou de 25,9 a 462  $\mu\text{g g}^{-1}$  (SANTOS et al., 2017). Porém as concentrações determinadas neste trabalho são menores que as encontradas em amostras de chás emagrecedores, para as quais as concentrações de Fe e Ni variaram de 195 a 276  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 3,89 a 6,07  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente (SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2014b).

Em geral, as amostras contendo extratos vegetais (GUA-01 a GUA-05), principalmente *Paullinia cupana*, apresentaram quantidades de Fe e Ni superiores as demais amostras analisadas neste trabalho. Ambos os elementos são considerados micronutrientes essenciais para as plantas e, deste modo, estão naturalmente presente nos extratos vegetais, enquanto as amostras de SVM e termogênicos são constituídas de substâncias sintéticas. Adicionalmente, as amostras de guaraná que apresentaram maiores teores de Ni também apresentaram maiores teores de Fe, o que pode ser atribuído ao fato de Ni aumentar a absorção de Fe pelas plantas.

Segundo as Ingestões Dietéticas de Referência (DRIs) elaboradas pelo comitê do Food and Nutrition Board/Institute of Medicine, a RDA de ferro para homens e mulheres adultos é de 8 e 18 mg/dia, respectivamente. O Limite Superior Tolerável de níquel e ferro é de 1 e 45 mg/dia, respectivamente (IOM, 2001). Conforme a classificação da European Medicines Agency (2018), na qual as impurezas metálicas são classificadas de acordo com o risco potencial para a saúde humana, o Ni pertence à Classe 2A. A Classe 2A é de grande preocupação de segurança e inclui metais que são conhecidos ou suspeitos como carcinogênicos, ou possíveis agentes causais de outras toxicidades significativas. O limite de concentração para exposição oral para Ni é de 200  $\mu\text{g}/\text{dia}$ . Deste modo, as concentrações de Fe e Ni determinadas nas amostras analisadas neste trabalho não apresentam risco a saúde,

uma vez que estão abaixo do Limite Superior Tolerável de Ingestão e do limite de concentração para exposição oral.

Os resultados do desenvolvimento, validação e aplicação da metodologia de HR-CS SS-GF AAS para a determinação simultânea de Fe e Ni nas amostras de suplementos vitamínicos minerais foram publicados na *Talanta*, v. 195, p. 745-751, 2019 (apêndice A).

## 5 CONCLUSÕES

O método proposto por HR-CS SS-GF AAS demonstrou a possibilidade de determinar simultaneamente Fe e Ni como contaminantes em amostras de suplementos alimentares usando amostragem direta de sólidos e calibração contra padrões aquosos. O uso de linhas alternativas tornou possível evitar interferências espectrais causadas por moléculas diatômicas com estrutura rotacional fina. Adicionalmente, o uso destas linhas menos sensíveis é particularmente vantajoso na análise direta de amostras sólidas quando os analitos estão presentes em concentrações relativamente mais elevadas.

O estudo da massa de amostra introduzida no atomizador mostrou que a influência da massa de amostra em relação aos valores de absorvância depende da natureza da amostra. De acordo com o fator de homogeneidade, as amostras foram consideradas homogêneas dentro dos intervalos de massa selecionados para cada tipo de amostra.

Considerando que Fe e Ni são termicamente estáveis e possuem volatilidades semelhantes, foi possível estabelecer um programa de temperatura comum para estes analitos no qual as temperaturas de pirólise e atomização são próximas dos valores ótimos para cada elemento, permitindo a determinação simultânea dos mesmos.

Não foram observados efeitos da matriz das amostras em relação aos sinais analíticos, possibilitando a quantificação dos analitos a partir de calibração contra padrões aquosos.

A avaliação de diferentes procedimentos de digestão das amostras demonstrou a importância de utilizar os reagentes adequados nesta etapa.

O método proposto é mais simples que os métodos convencionais baseados na digestão ácida das amostras, sendo capaz de fornecer resultados confiáveis e de forma rápida. A determinação simultânea de Fe e Ni é realizada em poucos minutos, utilizando uma pequena massa de amostra e sem o uso de reagentes adicionais. Deste modo, o método apresenta vantagens como aumentar a taxa de amostragem, economizar tempo de análise e materiais, além de eliminar o uso de reagentes corrosivos e perigosos, contribuindo também para a química verde.

## REFERÊNCIAS

- ABE-MATSUMOTO, L. T.; SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, p. 1371-1380, 2015.
- ADOLFO, F. R. et al. Simultaneous determination of cobalt and nickel in vitamin B12 samples using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 147, p. 241-245, 2016.
- ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Uso de suplementos alimentares por adolescentes. **Jornal de pediatria**, v. 85, n. 4, 2009.
- AMADOR, J. P. et al. Análise das pressuposições e adequação dos resíduos em modelo de regressão linear para valores individuais, ponderados e não ponderados, utilizando procedimentos do SAS®. **Ciência e Natura**, v. 33, n. 2, p. 07-22, 2011.
- AMORIM FILHO, V. R.; POLITO, W. L.; GOMES NETO, J. A. Comparative studies of the sample decomposition of green and roasted coffee for determination of nutrients and data exploratory analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 47-53, 2007.
- AMORIM, F. A. C. et al. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.
- ANDERSON, G. J.; MCLAREN, G. D. **Iron physiology and pathophysiology in humans**. New York: Springer Science and Business Media, 2012.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. **Official methods of analysis**. Rockville, MD: AOAC International; 2013.
- ARAUJO, R. G. O. et al. Correction of structured molecular background by means of high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry—determination of antimony in sediment reference materials using direct solid sampling. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 846-852, 2009.
- ARRUDA, M. A. Z.. **Trends in sample preparation**. New York: Nova Science Publishers, 2007.
- ASHU, R.; CHANDRAVANSI, B. S. Concentration levels of metals in commercially available Ethiopian roasted coffee powders and their infusions. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 25, n. 1, 2011.
- ATHAVALE, V. T.; PRABHU, L. H.; VARTAK, D. G. Solution stability constants of some metal complexes of derivatives of catechol. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 1237-1249, 1966.
- AVULA, B. et al. Inorganic elemental compositions of commercial multivitamin/mineral dietary supplements: Application of collision/reaction cell inductively coupled-mass spectroscopy. **Food chemistry**, v. 127, n. 1, p. 54-62, 2011.

- BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals—Status, challenges and moving frontiers. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 83-95, 2016.
- BARIN, J. S. et al. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 17, p. 4547-4566, 2016.
- BAXTER, D. C.; FRECH, W. On the direct analysis of solid samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 337, n. 3, p. 253-263, 1990.
- BELARRA, M. A. et al. Direct determination of cobalt and zinc in samples of different volatility by means of solid sampling—graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 10, p. 1847-1858, 2003.
- BELARRA, M. A. et al. Direct determination of metals in solid samples by graphite-furnace atomic absorption spectrometry: Does sample mass influence the analytical results?. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 52, n. 12, p. 1855-1860, 1997.
- BELARRA, M. A. et al. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 828-839, 2002.
- BERGLUND, M.; BAXTER, D. C. Methods of calibration in the direct analysis of solid samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 47, n. 14, p. 1567-1586, 1992.
- BITTENCOURT, L. S. et al. Antioxidant profile characterization of a commercial Paullinia cupana (Guarana) extracts. **J Nat Prod Res**, v. 2, n. 1, p. 47-52, 2016.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene HFE. O que conhecemos na população brasileira?. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 29, n. 4, p. 341-342, 2007.
- BORGES, D. L. G. et al. Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 8, p. 763-769, 2006.
- BORGES, D. L. G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, n. 18, p. 58-67, 2005.
- BOSCHETTI, W. et al. Simultaneous determination of Mo and Ni in wine and soil amendments by HR-CS GF AAS. **Analytical Methods**, v. 6, n. 12, p. 4247-4256, 2014.
- BRANDÃO, G. P. et al. Direct determination of nickel in petroleum by solid sampling—graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 386, n. 7-8, p. 2249-2253, 2006.

BRASIL, IN ANVISA n° 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares.

**Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 27 de julho de 2018. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN\\_28\\_2018\\_COMP.pdf/db9c7460-ae66-4f78-8576-dfd019bc9fa1](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_COMP.pdf/db9c7460-ae66-4f78-8576-dfd019bc9fa1)>. Acessado em: 14 agos. 2018. (a).

BRASIL, O que é e para que serve o suplemento alimentar?. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2867826&_101_type=content&_101_g)

[1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=2867826&\\_101\\_type=content&\\_101\\_g](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2867826&_101_type=content&_101_g)>. Acessado em: 28 mai. 2018.

BRASIL, RDC ANVISA n° 239, de 26 de julho de 2018. Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 27 de julho de 2018. Disponível em:<

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898839/RDC\\_239\\_2018\\_.pdf/05e2f081-e98f-4afd-af5d-04392e176717](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898839/RDC_239_2018_.pdf/05e2f081-e98f-4afd-af5d-04392e176717)>. Acessado em: 13 agos. 2018. (b).

BRASIL, RDC ANVISA n° 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 27 de julho de 2018. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC\\_243\\_2018\\_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_243_2018_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15)>. Acessado em: 13 agos. 2018. (c).

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Microchimica Acta**, v. 128, n. 1-2, p. 93-106, 1998.

CANFRANC, E. et al. Determination of iron and molybdenum in a dietetic preparation by flame AAS after dry ashing. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, n. 1, p. 103-108, 2001.

CARVALHO, P. B.; ARAÚJO, W. M. C. Rotulagem de suplementos vitamínicos e minerais: uma revisão das normas federais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 779-791, 2008.

CEMPEL, M.; NIKEL, G. Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 3, 2006.

CORREIA, P. R. M.; NOMURA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas. **Revista Analytica**, v. 5, n. 11, p. 52-59, 2003.

COŞKUN, N.; AKMAN, S. Direct determination of manganese in vitamin–mineral tablets using solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 496-500, 2004.

DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 4, p. 412, 2008.

- DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. A. Nickel: molecular diversity, application, essentiality and toxicity in human health. **in Biometals: Molecular Structures, Binding Properties and Applications, ISBN**, v. 978, p. 1-60876, 2010.
- DA SILVA, A. F. et al. Determination of cadmium in coal using solid sampling graphite furnace high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 382, n. 8, p. 1835-1841, 2005.
- DA SILVA, G. S. et al. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. **Food Research International**, v. 102, p. 700-709, 2017.
- DE ANDRADE, R. M. et al. Direct Determination of Trace Elements in Meat Samples via High-Resolution Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 5, p. 1209-1215, 2017.
- DE GOIS, J. S. et al. Direct solid analysis for the determination of Mn, Ni, Rb and Sr in powdered stimulant plants using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry followed by chemometric classification based on elemental composition, polyphenol content and antioxidant activity. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 283-289, 2016.
- DE PAULA, C. E. R. et al. Avaliação de métodos de extração para a determinação de cromo e níquel em formulações farmacêuticas e em matérias-primas usadas na fabricação de medicamentos à base de cefalexina e ciprofloxacino. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1858-1864, 2012.
- DE SOUSA, S. A. et al. Dissolution test of herbal medicines containing *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and assessment of dissolution. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 269-277, 2011.
- DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, n. 1, p. 35-56, 2002.
- DITTERT, I. M. et al. Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 537-543, 2009.
- DOS SANTOS, L. M. G. et al. Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 577-583, 2009.
- DOS SANTOS, L. O. et al. Direct and Simultaneous Determination of Copper and Iron in Flours by Solid Sample Analysis and High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 469-476, 2017.
- DURÃO, C. R. Suplementos Alimentares—Legislar é suficiente?. **Alimentação Humana**, v. 14, n. 2, p. 77-87, 2008.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2011.

ELHABIRI, M. et al. Complexation of iron (III) by catecholate-type polyphenols. **Inorganica chimica acta**, v. 360, n. 1, p. 353-359, 2007.

European Medicines Agency (EMA). **ICH guideline Q3D (R1) on elemental impurities**. London, 2018. Disponível em: <[https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q3d-r1-elemental-impurities-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q3d-r1-elemental-impurities-step-2b_en.pdf)>. Acessado em: 22 jan. 2019.

FILIPIAK-SZOK, A. et al. Elemental analysis of medicinal herbs and dietary supplements. **Analytical Letters**, v. 48, n. 16, p. 2626-2638, 2015.

FILIPIAK-SZOK, A.; KURZAWA, M.; SZŁYK, 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, 2014.

FONTENELE, M. L. S., LUNA, G. I. Regulamentação da Suplementação Nutricional no Brasil. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 2, n. 1, p. 82-94, 2013.

FRAGA, C. G. et al. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, n. 6, p. 435-445, 2010.

FREITAS, M. et al. Nickel induces apoptosis in human neutrophils. **Biometals**, v. 26, n. 1, p. 13-21, 2013.

FRENTIU, T. et al. Analytical capability of a medium power capacitively coupled plasma for the multielemental determination in multimineral/multivitamin preparations by atomic emission spectrometry. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2447-2452, 2012.

GAHCHE, J. et al. Dietary supplement use among US adults has increased since NHANES III (1988-1994). **NCHS data brief**, n. 61, p. 1-8, 2011.

GALARIS, D.; PANTOPOULOS, K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 45, n. 1, p. 1-23, 2008.

GARCÍA-RICO, L.; LEYVA-PEREZ, J.; JARA-MARINI, M. E. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1599-1605, 2007.

GÓMEZ-NIETO, B. et al. Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 860-865, 2013.

GOYER, R. A. Toxic and essential metal interactions. **Annual review of nutrition**, v. 17, n. 1, p. 37-50, 1997.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

GURLEY, B. J.; STEELMAN, S. C.; THOMAS, S. L. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: history, safety, and efficacy. **Clinical therapeutics**, v. 37, n. 2, p. 275-301, 2014.

HABER, L. T. et al. Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 231-241, 2000.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; DE MEJIA, E. G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of food science**, v. 75, n. 3, p. R77-R87, 2010.

HEITMANN, U. et al. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 11, p. 1222-1230, 2007.

HIDER, R. C.; LIU, Z. D.; KHODR, H. H. Metal chelation of polyphenols. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2001. p. 190-203.

HIGGINS, J. P.; TUTTLE, T. D.; HIGGINS, C. L. Energy beverages: content and safety. **Mayo Clin Proc**. v. 85, n.11, p.1033-41, 2010.

HOENIG, M. et al. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 85-94, 1998.

HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis—facts and traps. **Talanta**, v. 54, n. 6, p. 1021-1038, 2001.

HUANG, X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 533, n. 1, p. 153-171, 2003.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, DOQ-CGCRE-008, revisão 4, 2011.

Institute of Medicine (IOM). **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Report of the Panel on Micronutrients, Dietary Supplements**. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

JABBAR, A.; KABIR, H.; CHOWDHURY, R. A. Influence Of Caffeine On The Redox Characteristics Of Iron In Aqueous Solution. **Journal of the Bangladesh Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 166-179, 2012.

JURCA, T. et al. Metals Determination by Microwave Digestion ICP-OES of Some Supplements. **Rev Chim (Bucharest)**, v. 62, p. 139-140, 2011.

KAMERUD, K. L.; HOBBIE, K. A.; ANDERSON, K. A. Stainless steel leaches nickel and chromium into foods during cooking. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9495-9501, 2013.

KHOKHAR, S.; APENTEN, R. K. O. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. **Food Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 133-140, 2003.

KOLAYLI, S. et al. Does caffeine bind to metal ions?. **Food chemistry**, v. 84, n. 3, p. 383-388, 2004.

KORFALI, S. I.; HAWI, T.; MROUEH, M. Evaluation of heavy metals content in dietary supplements in Lebanon. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 10, 2013.

KRAWCZYK, M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 88, p. 377-384, 2014.

KREJČOVÁ, A. et al. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction. **Food chemistry**, v. 98, n. 1, p. 171-178, 2006.

KURFÜRST, U. **Solid Sample Analysis: direct and slurry sampling using GF-AAS and ETV-ICP**. Berlin: Springer, 1998.

KUSKOSKI, E. M. et al. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (Paullinia cupana). **Vitae**, v. 12, n. 2, 2005.

LEAO, D. J. et al. Simultaneous determination of cadmium, iron and tin in canned foods using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 153, p. 45-50, 2016.

LEE, K. Y. C.; HOLTEN-ANDERSEN, N.; WAITE, J. H. **Methods of making self-healing polymer and gel compositions**. U.S. Patent Application n. 13/516,079, 28 fev. 2013.

LEPRI, F. G. et al. Determination of heavy metals in activated charcoals and carbon black for Lyocell fiber production using direct solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 980-987, 2010.

LIEU, P. T. et al. The roles of iron in health and disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 22, n. 1-2, p. 1-87, 2001.

LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 20-24, 2010.

MADER, P.; SZÁKOVÁ, J.; MIHOLOVÁ, D. Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. **Analisis**, v. 26, n. 3, p. 121-129, 1998.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARRA, M. V.; BOYAR, A. P. Position of the American Dietetic Association: nutrient supplementation. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 12, p. 2073-2085, 2009.

MARRERO, J. et al. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: Are the concentrations declared in the labels accurate?. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 81-86, 2013.

MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. **Food chemistry**, v. 66, n. 3, p. 365-370, 1999.

MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Characterization of green coffee varieties according to their metal content. **Analytica chimica acta**, v. 358, n. 2, p. 177-183, 1998.

MELLO, D.; KUNZLER, D. K.; FARAH, M. The caffeine and its ergogenic effect/A cafeína e seu efeito ergogênico. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 2, p. 30-42, 2007.

MESÍAS, M.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M. P. Iron nutrition in adolescence. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 11, p. 1226-1237, 2013.

MESTER, Z.; STURGEON, R. E. **Sample preparation for trace element analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2003.

MEYER, G.; NOCKEMANN, P. Affinity of divalent mercury towards nitrogen donor ligands. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 629, n. 9, p. 1447-1461, 2003.

MIERZWA, J. et al. Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurry sampling electrothermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v. 47, n. 5, p. 1263-1270, 1998.

MIRANDA, M. V.; METZNER, B. S. Paullinia cupana: revisão da matéria médica. **Revista de Homeopatia**, v. 73, n. 1/2, p. 1-17, 2010.

MLADĚNKA, P. et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 693-701, 2011.

MOMEN, A. A. et al. Optimization and comparison of two digestion methods for multi-element analysis of certified reference plant materials by ICP-AES. Application of Plackett-Burman and central composite designs. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 4, p. 397-403, 2008.

MUDGAL, V. et al. Effect of toxic metals on human health. **The Open Nutraceuticals Journal**, v. 3, n. 1, p. 94-99, 2010.

NATA. National Association of Testing Authorities. **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. Technical Note 17. Australia, 2012.

NETO BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP; 2001.

NOMURA, C. S.; SILVA, C. S. da; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 104-113, 2008.

O'CONNELL, B. S. Select vitamins and minerals in the management of diabetes. **Diabetes Spectrum**, v. 14, n. 3, p. 133-148, 2001.

OLIVA, S. R.; RAITIO, H.; MINGORANCE, M. D. Comparison of Two Wet Digestion Procedures for Multi-element Analysis of Plant Samples. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 34, n. 19-20, p. 2913-2923, 2003.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

PEETERS, K. et al. Nickel speciation in cocoa infusions using monolithic chromatography–Post-column ID-ICP-MS and Q-TOF-MS. **Food chemistry**, v. 230, p. 327-335, 2017.

PERRON, N. R. et al. Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 41, p. 9982-9987, 2010.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 53, n. 2, p. 75-100, 2009.

PINYOU, P. et al. Flow injection determination of iron ions with green tea extracts as a natural chromogenic reagent. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 619-623, 2010.

POHL, P. et al. Determination of the elemental composition of coffee using instrumental methods. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 598-613, 2013.

POZZATTI, M. et al. Simultaneous determination of nickel and iron in vegetables of Solanaceae family using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 162-167, 2017.

PRÁ, D. et al. Iron and genome stability: an update. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 733, n. 1, p. 92-99, 2012.

PRASAD, M. N. V. **Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 299-312, 2005.

QUADROS, D. P. C. et al. A simple and fast procedure for the determination of Al, Cu, Fe and Mn in biodiesel using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 373-377, 2011.

RAJPATHAK, S. N. et al. The role of iron in type 2 diabetes in humans. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 7, p. 671-681, 2009.

RÊGO, J. F. et al. Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling. **Talanta**, v. 100, p. 21-26, 2012.

RESANO, M. et al. Evaluation of solid sampling-electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry and solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of Cr in various materials using solution-based calibration approaches. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 8, p. 958-965, 2004.

RESANO, M. et al. Simultaneous determination of Co, Fe, Ni and Pb in carbon nanotubes by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 657-665, 2013.

RESANO, M., et al. On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 321-328, 2011.

RESANO, M.; ARAMENDÍA, M.; BELARRA, M. A. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: a tutorial review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 12, p. 2229-2250, 2014.

RESANO, M.; FLÓREZ, M. R. Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 3, p. 401-412, 2012.

RESANO, M.; FLÓREZ, M. R.; GARCÍA-RUIZ, E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 85-97, 2013.

RESANO, M.; FLÓREZ, M. R.; GARCÍA-RUIZ, E. Progress in the determination of metalloids and non-metals by means of high-resolution continuum source atomic or molecular absorption spectrometry. A critical review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 9-10, p. 2239-2259, 2014.

RESANO, M.; GARCÍA-RUIZ, E. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 1, p. 323-330, 2011.

RESANO, M.; VANHAECKE, F.; DE LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry—a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, n. 11, p. 1450-1475, 2008.

RIBEIRO, A. S. et al. Determination of cobalt in biological samples by line-source and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 693-698, 2005.

RICCIARDI, L. et al. Nickel allergy, a model of food cellular hypersensitivity?. **Allergy**, v. 56, p. 109-112, 2001.

ROBINSON, J. W.; FRAME, E. S.; FRAME II, G. M. **Undergraduate instrumental analysis**. 6 ed., New York: Marcel Dekker, 2005.

ROCK, C. L. Multivitamin-multimineral supplements: who uses them?-. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 1, p. 277S-279S, 2007.

SANTOS, H. M. et al. Microwave-assisted digestion using diluted HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. **Food Chemistry**, 2017

SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.

SHALTOUT, A. A. et al. Determination of Cd, Cu, Ni, and Pb in black tea from Saudi Arabia using graphite furnace atomic absorption spectrometry after microwave-assisted acid digestion. **Analytical Letters**, v. 46, n. 13, p. 2089-2100, 2013.

SILVEIRA, J. Q.; BURIAN, J. P.; AMORIM, L. L. Efeito ergogênico da suplementação aguda de pó de guaraná em lutadores de jiu-jitsu. **RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 12, n. 70, p. 246-254, 2018.

SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

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

SOARES, B. M. et al. Simultaneous determination of iron and nickel in fluoropolymers by solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 160, p. 454-460, 2016.

SOLTYK, K. et al. Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 32, n. 3, p. 425-432, 2003.

SONI, M.G. et al. Safety of vitamins and minerals: controversies and perspective. **Toxicological sciences**, v. 118, n. 2, p. 348-355, 2010.

SORIANO, S.; NETTO, A. D. P.; CASSELLA, R. J. Determination of Cu, Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in multivitamin/multimineral dosage forms or tablets after an acidic extraction. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 1, p. 304-310, 2007. (a).

SORIANO, S.; NETTO, A. D. P.; CASSELLA, R. J. Multivariate optimization of a microwave-assisted leaching procedure using dilute acid solutions, for FAAS determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in multivitamin/multimineral supplements. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 387, n. 3, p. 1113-1120, 2007. (b).

SOUSA, S. A. et al. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 866-870, 2010.

SOUSA, S. A. et al. Dissolution test of herbal medicines containing *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and assessment of dissolution. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 269-277, 2011.

SPIEWAK, R.; PIETOWSKA, J.; CURZYTEK, K. Nickel: a unique allergen—from molecular structure to European legislation. **Expert review of clinical immunology**, v. 3, n. 6, p. 851-859, 2007.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.. The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1956-1961, 2013.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Fast method of elements determination in slim coffees by ICP OES. **Food chemistry**, v. 146, p. 220-225, 2014. (a).

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Simple and fast sample preparation procedure prior to multi-element analysis of slim teas by ICP OES. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 10, p. 2051-2063, 2014 (b).

SWANSON, C. A. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. **Alcohol**, v. 30, n. 2, p. 99-102, 2003.

TEMPLETON, D. M. **Molecular and cellular iron transport**. New York: Marcel Dekker, 2002.

TFOUNI, S. A. V. et al. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Revista de Nutrição**, 2007.

TUMIR, H. et al. Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplements on the Croatian market. **Food control**, v. 21, n. 6, p. 885-889, 2010.

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

VALDIVIA, A. C. et al. Simultaneous determination of V, Ni and Fe in fuel fly ash using solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 179, p. 1-8, 2018.

VALE, M. G. R.; OLESZCZUK, N. ; DOS SANTOS, W. N. L. Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry—a critical review of the development between 1995 and 2005. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 4, p. 377-400, 2006.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007.

VIRGILIO, A. et al. Evaluation of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct determination of chromium in medicinal plants. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 78, p. 58-61, 2012.

WELZ, B. et al. Continuum source atomic absorption spectrometry: past, present and future aspects—a critical review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 799-821, 2014.

WELZ, B. et al. Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces — a review. **Analytica chimica acta**, v. 647, n. 2, p. 137-148, 2009.

WELZ, B. et al. High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry — Theory and Applications. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, John Wiley & Sons Ltd., 2010. (a)

WELZ, B. et al. High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry—a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 5, p. 327-354, 2010. (b).

WELZ, B. et al. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry—an analytical and diagnostic tool for trace analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 873-883, 2007. (a).

WELZ, B. et al. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 7-8, p. 2085-2095, 2007(b).

WELZ, B. et al. **High-resolution continuum source AAS: The better way to do atomic absorption spectrometry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

WELZ, B. High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 1, p. 69-71, 2005.

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

WELZ, B.; VALE, M. G. R. Atomic Absorption Spectrometry and Related Techniques, in J Cazes (ed.) **Ewing's Analytical instrumentation Handbook**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2004.

WITTSIEPE, J. et al. Dietary intake of nickel and zinc by young children—results from food duplicate portion measurements in comparison to data calculated from dietary records and available data on levels in food groups. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 23, n. 3, p. 183-194, 2009.

ZACHARIADIS, G. A.; OLYMPIOU, A. F. Use of slurry suspension sample introduction technique in fast multielement analysis of multimineral and multivitamin formulations by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 3, p. 541-546, 2008.

ZAMBELLI, B.; UVERSKY, V. N.; CIURLI, S. Nickel impact on human health: An intrinsic disorder perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 12, p. 1714-1731, 2016

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZIMMERMANN, M. B.; HURRELL, R. F. Nutritional iron deficiency. **The Lancet**, v. 370, n. 9586, p. 511-520, 2007.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A

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*, 195 (2019) 745-751.

Talanta 195 (2019) 745–751



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Talanta

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



### Simultaneous determination of iron and nickel as contaminants in multimineral and multivitamin supplements by solid sampling HR-CS GF AAS



Franciele Rovasi Adolfo, Paulo Cícero do Nascimento\*, Gabriela Camera Leal, Denise Bohrer, Carine Viana, Leandro Machado de Carvalho, Alexsandro Nunes Colim

*Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97111-900 Santa Maria, RS, Brazil*

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

High-resolution continuum source GF AAS  
Simultaneous Fe and Ni determination  
Direct solid sample analysis  
Contamination  
Multimineral and multivitamin supplements

#### ABSTRACT

A methodology to assay simultaneously iron and nickel present as contaminants in multimineral and multivitamin supplements was investigated. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis were used. Measurements were done with the secondary lines of Fe (352.604 nm) and Ni (352.454 nm) to avoid spectral interferences. The best temperatures for pyrolysis and atomization for Fe and Ni were 1000 and 2700 °C, respectively. Chemical modifiers were not necessary and no matrix effects were observed. Aqueous standard solutions were used for calibration. The limit of detection was 0.517  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Fe and 0.011  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Ni. The precision ranged from 4.3% to 17% and 4.4–20% for Fe and Ni, respectively. The method accuracy was confirmed by comparing statistically the results obtained by solid sampling with those of sample acid digestion. The proposed methodology was successfully applied to determine both metals in different multimineral and multivitamin supplements.