



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

EMANUELI DO NASCIMENTO DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE Se, Cr E Cu EM CORANTES
ALIMENTÍCIOS POR GF AAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA
ANALÍTICA.**

ORIENTADOR: Profa. Dra. SOLANGE CADORE

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR EMANUELI DO NASCIMENTO DA SILVA, E ORIENTADA PELA PROFa. DRa. SOLANGE CADORE.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Si38d	<p>Silva, Emanuéli do Nascimento da (1988-). Determinação de Se, Cr e Cu em corantes alimentícios por GF AAS / Emanuéli do Nascimento da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Solange Cadore. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. GF AAS. 2. Corantes alimentícios. 3. Modificador químico. I. Cadore, Solange. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Determination of Se, Cr and Cu in food dyes by GF AAS

Palavras-chave em inglês:

GF AAS
Food dyes
Chemical modifier

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Solange Cadore [Orientador]
José Anchieta Gomes Neto
Célio Pasquini

Data de defesa: 16/02/2012

Programa de pós-graduação: Química

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais Helena e Marco, aos meus irmãos Renatinha e Dener, à minha cunhada Ana Paula, à minha sobrinha Duda, ao meu sobrinho afilhado que eu amo tanto, Bernardo, e ao meu grande companheiro Gabriel!

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Gabriel, pelo carinho, amizade, incentivo e companheirismo de sempre e tudo mais!

A meus pais, meus irmãos, meus sobrinhos e minha cunhada Ana, por sempre me dar força e apoio em tudo.

À família Lengert Heerdt, uma segunda família para mim.

À Profa. Dra. Solange Cadore, primeiramente por aceitar-me como aluna e, também, pela ajuda, a amizade e, principalmente, pelo conhecimento a mim transmitido.

Ao professor Nivaldo Baccan, por toda a ajuda e conhecimento oferecido.

Ao professor Jarbas José Rodrigues Rohwedder, por toda a ajuda de sempre!

A todos aos amigos do laboratório, Lívia, Ricardo, Mariane, Samanta, Renata, Elaine, Eliana, Gilze, Mário, Rafael Arromba, Rafael IC, Rafaella, Andrea e em especial à Daiane e Greice, pela ajudinha “básica” com o forno. Principalmente à Mirla, que esteve ao meu lado em todos os momentos.

A TODOS meus amigos extra-lab, foram muito importante, principalmente o Richard Piffer Soares de Campos e a Camila Alves de Lima, obrigada por tudo!

A todos os professores que fizeram parte da minha formação.

A todos os funcionários do IQ.

Ao Instituto de Química.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

ARMAS QUÍMICAS E POEMAS

Engenheiros do Hawaii
(Humberto Gessinger)

*Eu me lembro muito bem, como se fosse amanhã
o sol nascendo sem saber o que iria iluminar
eu abri meu coração como se fosse um motor
e na hora de voltar sobravam peças pelo chão
mesmo assim eu fui à luta... Eu quis pagar pra ver*

*aonde leva essa loucura
qual é a lógica do sistema
onde estavam as armas químicas
o que diziam os poemas*

*afinal de contas
?o que nos trouxe até aqui, medo ou coragem?
Talvez nenhum dos dois
sopra o vento um carro passa pela praça
e já foi... Já foi
por acaso eu fui à luta... Eu quis pagar pra ver*

*aonde leva essa loucura
qual é a lógica do sistema
onde estavam as armas químicas
o que diziam os poemas*

*o tempo nos faz esquecer o que nos trouxe até aqui
mas eu lembro muito bem como se fosse amanhã*

*?quem prometeu descanso em paz
depois dos comerciais?
?Quem ficou pedindo mais
armas químicas e poemas?*

SÚMULA CURRICULAR

Emanuelli do Nascimento da Silva

Brasileira, natural de Guarapuava-PR

Data de Nascimento: 11/12/1988

Formação Acadêmica

2006 – 2009: Bacharelado em Química – Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO

2008 – 2009: Iniciação Científica – Extração em fase sólida e pré-concentração de Cd em resina de quitosana modificada.

Atuação Profissional

2007 – 2007 e 2009 – 2009: Estagiário, Enquadramento Funcional: Técnico (Almoxarifado de Química), Carga horária: 20, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO.

Atividades Acadêmicas

Participação no Programa de Estágio Docente (PED C) – Período: 8-12/2010. Disciplina de QA 313/Química III (Engenharia Química) – Instituto de Química – Departamento de Química Analítica – UNICAMP.

Participação no Programa de Estágio Docente (PED C) – Período: 3-7/2011. Disciplina de QA 213/Química II (Engenharia de Alimentos) – Instituto de Química – Departamento de Química Analítica – UNICAMP.

Participação no Programa de Estágio Docente (PED C) – Período: 8-12/2011. Disciplina de QA 582/Química Analítica Instrumental I (Química) – Instituto de Química – Departamento de Química Analítica – UNICAMP.

Participou de um curso sobre Especificação, ministrado pela Profa. Dra. Eva Maria Krupp (University of Aberdeen) – UNICAMP (2011).

Participou de um minicurso sobre Uso de Nanomateriais na Construção de Sensores Eletroquímicos (18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química da Região Sul (2010).

Participou de um minicurso sobre Energias e tecnologias menos poluentes. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO (2008).

Participou de um minicurso sobre Química Nuclear. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO (2007).

Publicação

1 – Artigo Submetido: E. N. Silva, N. Baccan, S. Cadore, Study using GF AAS of chemical modifiers for the determination of selenium in food dye.

2 – Artigo Submetido: E. N. Silva, S. P. Quinaia, E. M. Ganzarolli, K. C. Justi. Automatized system for separation and preconcentration of Cd (II) in natural waters using modified chitosan with 2-[2-(hydroxybenzyl)-2-(pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methyl-6-formyl-phenol.

RESUMO

Determinação de Se, Cr e Cu em corantes alimentícios por GF AAS

Autor: Emanuelli do Nascimento da Silva

Orientadora: Profa Dra Solange Cadore

Para o desenvolvimento de um método para a determinação de Se em corantes alimentícios por GF AAS, foi feito um estudo com diversos modificadores químicos, avaliando as temperaturas ótimas de pirólise e de atomização, bem como diferentes procedimentos para o preparo da amostra. O método escolhido para a determinação do analito foi o ajuste de matriz (*matrix-matching*), utilizando o corante E-132. A DA (dissolução ácida) mostrou-se um tratamento adequado para a amostra, o modificador químico selecionado foi o Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg e as temperaturas ótimas foram 1300 °C para a pirólise e 1800 °C para a atomização. O método apresentou exatidão e precisão adequadas, uma vez que as recuperações ficaram entre 90 e 100% e os desvios relativos foram menores que 10% para todos os corantes. Os limites de detecção e de quantificação foram 0,62 e 2,07 mg kg^{-1} , respectivamente. Para Cr e Cu também foram estudados diferentes procedimentos para o preparo da amostra e temperaturas de pirólise e de atomização. Para Cr as temperaturas ótimas foram de 1500 °C para a pirólise e 2500 °C para a atomização, utilizando a DA como tratamento da amostra e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 15 μg como modificador químico. O método utilizando uma curva de calibração externa para a determinação de Cr em corantes apresentou recuperações entre 90 e 110% com desvios relativos menores que 10%, mostrando exatidão e precisão para o método proposto. Os limites de detecção e de quantificação para o método foram 0,076 e 0,248 mg kg^{-1} e 0,169 e 0,556 mg kg^{-1} , para as curvas de menor e maior concentração, respectivamente. Já para Cu as temperaturas ótimas foram de 1200 °C para a pirólise e de 2000 °C para a atomização, utilizando a DA como tratamento da amostra e Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg como modificador químico. Entretanto, para este analito o método com a curva de calibração externa foi eficiente somente para os corantes E-102, E-110 e E-124, apresentando exatidão e precisão, com recuperações de 90-110% e desvios menores que 10%. Os limites de detecção e de quantificação para o método foram 0,030 e 0,102 mg kg^{-1} e 0,086 e 0,290 mg kg^{-1} , para

as curvas de menor e maior concentração, respectivamente. Já para os corantes E-132 e E-123, curvas de adição de padrão devem ser utilizadas para a determinação dos analitos nos corantes alimentícios. Para o corante E-132 o LOD foi de $0,109 \text{ mg kg}^{-1}$ e o LOQ de $0,364 \text{ mg kg}^{-1}$, e para o corante E-123 o LOD foi de $0,063 \text{ mg kg}^{-1}$ e o LOQ de $0,211 \text{ mg kg}^{-1}$.

ABSTRACT

Determination of Se, Cr and Cu in food dyes by GF AAS

Author: Emanuelli do Nascimento da Silva

Supervisor: Profa Dra Solange Cadore

A study with various chemical modifiers for the determination of Se in food dyes by GF AAS was developed, assessing the optimum pyrolysis and atomization temperatures, as well as different procedures for sample preparation. The method selected for the determination of the analyte was the matrix-matching, using the E-132 dye. The AD (acid dissolution) showed to be an appropriate treatment for the sample, while 5 μg Pd/3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ was the chemical modifier selected and optimum temperatures were 1300 °C for pyrolysis and 1800 °C for atomization. The method presented adequate accuracy and precision, considering that recoveries were within the 90 and 100% range and the relative standard deviations were < 10% for all dyes studied. The limits of detection and quantification were 0.62 and 2.07 mg kg^{-1} , respectively. For Cr and Cu it was also studied different procedures for sample preparation and temperatures of pyrolysis and atomization. For Cr the optimum temperatures were 1500 °C for pyrolysis and 2500 °C for the atomization using AD as a sample treatment and 15 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ as chemical modifier. The method using an external calibration curve for the determination of Cr in dyes presented recoveries within the 90 and 110% range with relative standard deviations < 10%, showing accuracy and precision for the proposed method. Limits of detection and quantification for the method of 0.076 and 0.248 mg kg^{-1} and 0.169 and 0.556 mg kg^{-1} were obtained for the curves of lower and higher concentrations, respectively. The optimum temperatures for Cu were 1200 °C for pyrolysis and 2000 °C for the atomization using AD as a sample treatment and using 5 μg Pd/3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ as chemical modifier. However, the external calibration curve was efficient only for E-102, E-110 and E-124 dyes, which allowed recoveries between 90 and 110% and relative standard deviations < 10%. The limits of detection and quantification for the method were 0.030 and 0.102 mg kg^{-1} and 0.086 and 0.290 mg kg^{-1} for the lower and higher concentrations curves, respectively. For E-132 and E-123 dyes, standard addition calibration curves should be used for the

determination of Cu in food dyes. For E-132 the LOD was 0.109 mg kg^{-1} and LOQ was 0.364 mg kg^{-1} , and for E-123 the LOD was 0.063 mg kg^{-1} and LOQ was 0.211 mg kg^{-1} .

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE FIGURAS	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 CORANTES ALIMENTÍCIOS ARTIFICIAIS.....	4
3.1.1 CORANTES TRIFENILMETANOS	7
3.1.2 CORANTE DA CLASSE DOS INDIGÓIDES	9
3.1.3 CORANTE DA CLASSE XANTENO.....	9
3.1.4 CORANTES AZO	9
3.2 SELÊNIO, CROMO E COBRE	11
3.3 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE	13
3.3.1 CONCEITO STPF	14
3.3.2 MODIFICADORES QUÍMICOS	15
3.4 TRATAMENTO DA AMOSTRA	18
3.4.1 MINERALIZAÇÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS (MW)..	19
3.4.2 SOLUBILIZAÇÃO EM BANHO DE ULTRASSOM (US)	21
3.4.3 MÉTODOS SIMPLES PARA A INTRODUÇÃO DA AMOSTRA - DISSOLUÇÃO ÁCIDA (DA).....	23
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	26
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	26
4.2 REAGENTES	26
4.3 PROCEDIMENTOS PARA O TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	27
4.3.1 MINERALIZAÇÃO VIA MW	27
4.3.2 EXTRAÇÃO VIA US.....	28
4.3.3 DISSOLUÇÃO ÁCIDA	29
4.4 MODIFICADOR QUÍMICO	29
4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRABALHO	32
4.5.1 OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA	32

4.5.2	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	32
4.6	FIGURAS DE MÉRITO.....	34
4.7	DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO, CROMO E COBRE	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	RESULTADOS PARA A OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA.....	36
5.1.1	SELÊNIO.....	36
5.1.1.1	RESULTADOS PARA O TRATAMENTO DA AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO.....	36
5.1.1.2	ESTUDO DE MODIFICADORES QUÍMICOS.....	38
5.1.1.2.1	MODIFICAÇÃO QUÍMICA CONVENCIONAL.....	38
5.1.1.2.2	MODIFICAÇÃO QUÍMICA PERMANENTE	41
5.1.1.3	ESTUDO DO TEMPO DE PIRÓLISE	47
5.1.1.4	DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO.....	47
5.1.2	CROMO E COBRE.....	51
5.1.2.1	DETERMINAÇÃO DE CROMO E COBRE	53
5.1.2.2	APLICAÇÃO	58
5.2	RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	60
6	CONCLUSÕES	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

ANVISA: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

APM: MATERIAL PARTICULADO NO AR

CNNPA: COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTO

CNS/MS: CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE VINCULADO AO MINISTÉRIO DA SAÚDE

CRM: MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

DA: DIGESTÃO ÁCIDA

DINAL/MS: DIVISÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS VINCULADA AO MINISTÉRIO DA SAÚDE

ET AAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

FAAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO POR CHAMA

FAO/WHO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION

GF AAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE

HG-AAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM GERAÇÃO DE HIDRETO

HR-CS ET AAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

HR-CS GF AAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE

ICP MS: ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

ICP OES: ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM FONTE DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

IDA: INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL

INS: INTERNATIONAL NUMBERING SYSTEM

LOD: LIMITE DE DETECÇÃO

LOQ: LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

LS GF AAS: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FONTE DE LINHA E ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE

m_o : MASSA CARACTERÍSTICA

MW: MICRO-ONDAS

RSD: DESVIO PADRÃO RELATIVO

STPF: STABILIZED TEMPERATURE PLATFORM FURNACE

UA-HF LPME: ASSISTED-HOLLOW FIBRE LIQUID-PHASE MICROEXTRACTION

US: BANHO DE ULTRASSOM

α : COEFICIENTE ANGULAR DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades de alguns corantes utilizados no Brasil.	8
Tabela 2. Requisitos instrumentais e operacionais necessários às condições STPF. ...	15
Tabela 3. Programa utilizado no forno de microondas para digestão de amostras de corante alimentício.	28
Tabela 4. Programa inicial de aquecimento do forno de grafite (a partir deste programa as temperaturas de pirólise e de atomização foram variadas).	28
Tabela 5. Sequência empregada para o 1º procedimento de revestimento da plataforma integrada com tungstênio.	30
Tabela 6. Sequência empregada para o 2º procedimento de revestimento da plataforma integrada com tungstênio.	30
Tabela 7. Sequência empregada para o procedimento de revestimento da plataforma integrada com irídio.	31
Tabela 8. Planejamentos experimentais feitos para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Se em corantes alimentícios.	33
Tabela 9. Planejamentos experimentais feitos para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Cr em corantes alimentícios.	34
Tabela 10. Figuras de mérito para as curvas analíticas, (A) curva de calibração externa e as curvas pelo método de adição de analito para os corantes.	49
Tabela 11. Recuperação de selênio em nível baixo [20 µg L ⁻¹], médio [50 µg L ⁻¹] e alto [80 µg L ⁻¹] nos corantes, utilizando a curva de calibração externa.	49
Tabela 12. Recuperação de Se [60 µg L ⁻¹] nos corantes, utilizando a curva de adição de analito do corante E-132.	50
Tabela 13. Figuras de mérito para as curvas analíticas de calibração externa para monitorar (A) menores e (B) maiores concentrações e as curvas pelo método de adição de analito para Cr.	54
Tabela 14. Figuras de mérito para as curvas analíticas de calibração externa para monitorar (A) menores e (B) maiores concentrações e as curvas pelo método de adição de analito para Cu.	55
Tabela 15. Teor de Cr encontrado nos corantes [2,5 g L ⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa (2-17,5 µg L ⁻¹), RSD e valores de recuperação em nível baixo 2 µg L ⁻¹ , médio 7,5 µg L ⁻¹ e alto 15 µg L ⁻¹	56

Tabela 16. Teor de Cr encontrado nos corantes [1,6 g L ⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa (10-80 µg L ⁻¹), RSD e valores de recuperação em nível baixo 10 µg L ⁻¹ e alto 70 µg L ⁻¹	56
Tabela 17. Teor de Cu encontrado nos corantes [12,5 g L ⁻¹ do corante] usando a curva analítica de calibração externa, RSD e valores de recuperação em nível baixo (2 e 10 µg L ⁻¹), médio (7; 10 e 17,5 µg L ⁻¹) e alto (12; 17,5 e 25 µg L ⁻¹).....	57
Tabela 18. Teor de Cu encontrado nos corantes [5 g L ⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa (10-100 µg L ⁻¹), RSD e valores de recuperação em nível baixo 10 µg L ⁻¹ e alto 90 µg L ⁻¹	57
Tabela 19. Teor de Cr e Cu encontrado nos corantes através da curva de adição de analito, RSD e valores de recuperação para 10 µg L ⁻¹	58
Tabela 20. Teor de Cr encontrado nos corantes [12,5 g L ⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa para monitorar baixas concentrações de Cr e RSDs das medidas.....	59
Tabela 21. Teor de Cu encontrado nos corantes [12,5 g L ⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa para monitorar baixas concentrações de Cu e RSDs das medidas.....	59
Tabela 22. Planejamentos experimentais, efeitos e interações significativas para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Se em corantes alimentícios.....	60
Tabela 23. Planejamentos experimentais, efeitos e interações significativas para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Cr em corantes alimentícios.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do corante Azul Patente [1, 16].	7
Figura 2. Estrutura química dos corantes 1) Azul Brilhante e 2) Verde Rápido [1, 16].	7
Figura 3. Estrutura química do corante Azul de Indigotina [1, 16].	9
Figura 4. Estrutura química do corante Eritrosina [1, 16].	9
Figura 5. Estrutura química dos corantes 1) Amaranto; 2) Ponceau 4R; 3) Amarelo Crepúsculo e 4) Azorrubina [1, 16].	10
Figura 6. Estrutura química do corante Vermelho 40 [1, 16].	10
Figura 7. Estrutura química do corante Tartrazina [1, 16].	11
Figura 8. Absorbância referente a 0,6 ng de Se presente no padrão e no corante e fundo do corante em diferentes concentrações de HNO ₃ .	36
Figura 9. Sinal para a absorbância para 0,6 ng de Se presente no corante e absorbância para o fundo em cada tratamento utilizado.	37
Figura 10. Curvas de pirólise e de atomização na presença de diferentes combinações de Pd/Mg para 2 ng de Se.	39
Figura 11. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se na presença de Pd, Ni, Ag e Mg como modificadores.	40
Figura 12. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se na presença de Pd/Ni e Ag/Ni como modificadores	40
Figura 13. Sinal para absorbância de 2 ng de Se utilizando H ₂ O ₂ como modificador (a - 20; b - 40; c - 60 % v/v de H ₂ O ₂).	41
Figura 14. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se utilizando W como modificador permanente.	42
Figura 15. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se utilizando Ir como modificador permanente.	43
Figura 16. Absorbância para 0,6 ng de Se presente no padrão e no corante, utilizando as melhores condições para cada modificador (1-Ir-Pd/Mg; 2-Ir-Pd/Ni; 3-W-Pd/Mg; 4- W-Pd/Ni; 5-Pd; 6-Ni; 7-Pd/Ni; 8-Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg, 9-Mg(NO ₃) ₂ 30 µg /Pd 30 µg).	44
Figura 17. Absorbância para o fundo no padrão e no corante (2,5 g L ⁻¹), utilizando as melhores condições para cada modificador (1-Ir-Pd/Mg; 2-Ir-Pd/Ni; 3-W-Pd/Mg; 4- W-Pd/Ni; 5-Pd; 6-Ni; 7-Pd/Ni; 8-Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg, 9-Mg(NO ₃) ₂ 30 µg /Pd 30 µg).	45

Figura 18. Perfil do sinal analítico para Se na presença de diferentes modificadores. a – 2 ng de Se no padrão aquoso e b – 2 ng de Se no corante (*Mg(NO ₃) ₂ 30 µg/Pd 30 µg).	46
Figura 19. Curvas analíticas de calibração externa e pelo método de adição de analito.	48
Figura 20. Curvas de pirólise e de atomização para 0,2 ng de Cr utilizando Mg(NO ₃) ₂ 15 µg como modificador.	51
Figura 21. Curvas de pirólise e de atomização para 0,2 ng de Cu utilizando Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg como modificador.....	52
Figura 22. Gráficos de Pareto para os resultados do 1º ao 4º planejamento experimental feito para a otimização multivariada na determinação de Se em corantes alimentícios.	62
Figura 23. Gráficos de Pareto para os resultados do 5º ao 7º planejamento experimental feito para a otimização multivariada na determinação de Se em corantes alimentícios.	63
Figura 24. Gráfico de Pareto para os resultados do 1º planejamento experimental feito para a otimização multivariada na determinação de Cr em corantes alimentícios.	68

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, o uso de corantes é bastante difundido, uma vez que proporcionam, intensificam, modificam ou suplementam a coloração perdida durante o processamento ou estocagem de diversos tipos de alimentos. Sob o ponto de vista de saúde pública, existem divergências sobre a inocuidade dos corantes artificiais permitidos no Brasil. A toxicidade dos corantes está relacionada à quantidade ingerida pelo consumidor, seja pelo consumo demasiado de alimentos naturalmente coloridos e/ou alimentos coloridos artificialmente, como também com a quantidade de corante adicionada ao alimento, que deve ser mínima, somente uma quantidade que permita ao corante conferir a cor desejada ao produto [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Levando em consideração a dieta alimentar, a população em geral está exposta a uma grande quantidade de alimentos que levam na sua composição substâncias usadas para melhorar suas características sensoriais. A relação entre o uso de corantes alimentícios e o efeito nocivo que pode causar à saúde humana poderá ser aumentada pela presença de elementos tóxicos ou de elementos essenciais em grande quantidade.

No Brasil, muitas indústrias de alimentos fazem uso de corantes alimentícios como ingredientes na produção do alimento. No entanto, os corantes utilizados por estas indústrias são importados, pois não há nenhum fabricante nacional de corantes artificiais [1]. São permitidos, no Brasil, 11 corantes artificiais para uso em alimentos e bebidas sendo eles: Azul de Indigotina, Amarelo Tartrazina, Amarantho, Amarelo Crepúsculo, Ponceau 4R, Vermelho de Eritrosina, Vermelho 40, Azul Brillante, Azorrubina, Verde Rápido e Azul Patente V [5]. Já a Resolução CNS/MS nº 04, sobre impurezas inorgânicas, apresenta o limite máximo de cada contaminante em corantes alimentícios, apenas para arsênio, chumbo, cobre, estanho e zinco [7].

Há muitos estudos que comprovam a toxicidade dos corantes, mas poucos destes estudos tratam da parte inorgânica, ou seja, dos contaminantes presentes nos corantes alimentícios artificiais, logo, novos métodos devem ser desenvolvidos para a avaliação da composição inorgânica desses corantes. Muitas técnicas estão disponíveis, sendo que uma delas é a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ET AAS).

A ET AAS oferece a vantagem da introdução da amostra com pouca ou nenhuma manipulação prévia. Apesar de a técnica em questão não apresentar muitas dificuldades na determinação de vários analitos, pois geralmente há eliminação quase integral da amostra, podem ocorrer algumas complicações na determinação de certos analitos, especialmente quando presentes em amostras muito complexas, como é o caso de corantes alimentícios. Por isso torna-se extremamente importante o uso de modificadores químicos em ET AAS. O Se apresenta um comprimento de onda muito baixo para a absorvância e baixos valores para a temperatura de pirólise, por isso, em muitos métodos é possível observar valores de absorção de fundo bastante altos, dificultando assim, a sua determinação em diversas matrizes [8, 9]. Por outro lado, a determinação de cromo e cobre apresenta menor grau de dificuldade. Apesar de o Cu também apresentar uma temperatura para a pirólise relativamente baixa, seu comprimento de onda é mais alto que o de Se, logo, o analito não sofre tanta interferência de moléculas. Já o Cr apresenta uma temperatura para a pirólise um pouco mais elevada, sendo que a remoção da matriz é favorecida no momento nesta etapa, facilitando assim, o desenvolvimento da maioria dos métodos para a sua determinação [10, 11, 12].

A presença destes analitos nos corantes é atribuída ao uso de catalisadores em etapas prévias da síntese das macromoléculas. Os elementos Se e Cu são de grande interesse por serem considerados essenciais em nível traço e tóxicos em maiores concentrações. As formas inorgânicas de Se são mais tóxicas que as formas orgânicas e sua particularidade é a pequena diferença entre a concentração considerada tóxica e a recomendada na dieta alimentar. Já o Cr^{3+} é considerado essencial em nível traço, enquanto o Cr^{6+} é considerado tóxico em qualquer concentração [8, 13, 14].

Considerando o número reduzido de estudos relacionados, a falta de informação na legislação brasileira, o interesse comercial da amostra e a importância dos elementos Se, Cr e Cu na área toxicológica e nutricional, este trabalho foi feito visando acrescentar novas informações sobre os corantes alimentícios permitidos no Brasil.

2 OBJETIVO

▪ Desenvolver métodos para a determinação de Se, Cr e Cu em corantes alimentícios por ET AAS. Para isso, será avaliado o melhor método para o tratamento da amostra, visando um procedimento com o menor número de etapas possível, bem como diferentes modificadores químicos para a determinação dos elementos de interesse.

▪ Para a obtenção das condições ótimas de trabalho, avaliar as estratégias de otimização univariada e multivariada utilizando planejamento experimental.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Corantes alimentícios artificiais

Sabe-se que aditivos alimentares são adicionados aos alimentos como substâncias complementares, principalmente os corantes, que são adicionados sem a função de aumentar o valor nutricional do alimento, somente com a função de colorir ou intensificar sua cor, aumentando, assim, a aceitabilidade do produto pelo consumidor [1, 2, 3, 4].

Nos séculos XVIII e XIX foram descobertos os primeiros corantes sintéticos. Em decorrência do efeito que a aparência do alimento causa na aceitação dos produtos, esses corantes começaram a ser amplamente comercializados e, mesmo alimentos de baixa qualidade, com a adição do corante, ganharam mais espaço na mesa do consumidor [1, 15, 16].

Desde a antiguidade, materiais retirados da natureza são utilizados para colorir os alimentos. O uso de substâncias artificiais para esse fim teve início apenas em 1856, com a síntese do primeiro corante derivado da hulha. A partir desta data, nos Estados Unidos e Europa, foram desenvolvidos e comercializados mais de uma centena de corantes artificiais [1, 15, 16].

Devido à diversidade de novos corantes, a legislação dos países que fazem uso dessas substâncias começou a variar substancialmente a lista dos permitidos. Com isso, esses países passaram a controlar o uso dos corantes com legislações mais adequadas, ou seja, com legislações que possuíssem limites e especificações de todos os corantes utilizados em alimentos. Portanto, foram criados comitês internacionais, tais como a Comissão do *Codex Alimentarius*, com o intuito de, entre outros objetivos, estabelecer especificações e critérios para a utilização de aditivos alimentares, incluindo os corantes sintéticos [1, 15, 16].

No Brasil, o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, dispunha sobre as normas técnicas especiais reguladoras do emprego de aditivos químicos em alimentos, sendo alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. A legislação foi alterada novamente por conta do Decreto nº 55.871 de março de 1965. Em 1977, a resolução CNNPA nº 44 estabeleceu as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes

empregados na produção de alimentos e bebidas. A Portaria nº 02 DINAL/MS, de 28 de janeiro de 1987, excluiu da Tabela I do Decreto 55871/65, os corantes Amarelo Ácido ou Amarelo Sólido (13015), Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina (69800), Laranja GGN (15980), Vermelho Sólido E (16045), e Escarlata GN (14815) para uso em alimentos. Pela legislação atual, através das Resoluções nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), são permitidos no Brasil para alimentos e bebidas o uso de apenas 11 corantes artificiais, sendo eles: Amarantho, Vermelho de Eritrosina, Vermelho 40, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brillante, Azorrubina, Verde Rápido e Azul Patente V. Já a Resolução CNS/MS nº 04, sobre impurezas inorgânicas, apresenta o limite máximo de cada contaminante em corantes alimentícios, apenas para arsênio ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$), chumbo ($10,0 \text{ mg kg}^{-1}$), cobre ($20,0 \text{ mg kg}^{-1}$), estanho ($250,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e zinco ($50,0 \text{ mg kg}^{-1}$) [1, 5, 7, 16].

Os corantes só podem ser considerados atóxicos à saúde se estiverem dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA ou pelo *Codex Alimentarius*. Esses órgãos são responsáveis por impor a quantidade diária aceitável de ingestão (IDA). O efeito nocivo causado por essas substâncias ainda está em discussão, e os estudos comprovam que a ingestão desses corantes podem causar desde urticárias, passando por asma e reações imunológicas, chegando até ao câncer em animais de laboratórios [1, 15, 16].

A relação entre o uso de corantes alimentícios e o efeito nocivo que pode causar à saúde humana, pode aumentar pela presença de elementos tóxicos ou pela presença de elementos essenciais em grande quantidade. A presença destes elementos nos corantes é atribuída ao uso de catalisadores em etapas prévias da síntese das macromoléculas [13]. Levando em consideração a dieta alimentar, a população em geral está exposta a uma grande quantidade de alimentos que possuem na sua composição substâncias usadas para melhorar suas características sensoriais, logo, a população pode estar exposta à contaminação por meio da ingestão de alimentos coloridos artificialmente.

Há muitos estudos que comprovam a toxicidade dos corantes, mas poucos destes estudos tratam da parte inorgânica, ou seja, dos contaminantes inorgânicos presentes nos corantes alimentícios artificiais. Apenas alguns procedimentos são descritos na literatura. Hepp fez a determinação de cromo no corante FD& Blue N° 1 por

fluorescência de raios-X [13] e arsênio em corantes por geração de hidreto [17]. Hepp *et al.* estudaram a determinação de Hg usando espectrometria de absorção atômica por vapor frio [18], enquanto Viñas *et al.* avaliaram a determinação de Hg, As, Cd e Pb em corantes usando ET AAS [3, 4] e Lindino *et al.* estudaram Pb, Cd, As, Al e Cr em corantes usando espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) [2].

Nas embalagens dos alimentos que contêm corantes em sua composição, deve haver indicações como “Colorido artificialmente”, bem como qual corante foi utilizado ou seu número de INS (*International Numbering System*). A Tabela 1 e mostra algumas propriedades físicas e químicas dos corantes artificiais permitidos no Brasil. Eles são divididos em quatro grupos de corantes: azo; trifenilmetanos; indigóides e xantenos [1, 15, 16].

3.1.1 Corantes trifenilmetanos

Esta classe apresenta uma estrutura básica de três radicais arila, em geral grupos fenólicos, ligados a um átomo de carbono central; apresentam, ainda, grupos sulfônicos que lhes conferem alta solubilidade em água. Da legislação brasileira estão presentes nessa classe:

- **Azul Patente V** (Figura 1) - Excelente estabilidade à luz, ácido e calor, mas apresenta descoloração na presença de ácido ascórbico e SO_2

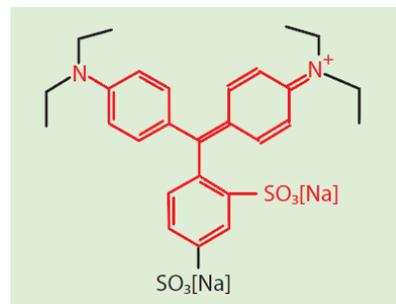


Figura 1. Estrutura química do corante Azul Patente [1, 16].

- **Verde Rápido e Azul Brillhante** (Figura 2)- Razoável estabilidade à luz, calor e ácido, mas possui baixa estabilidade oxidativa.

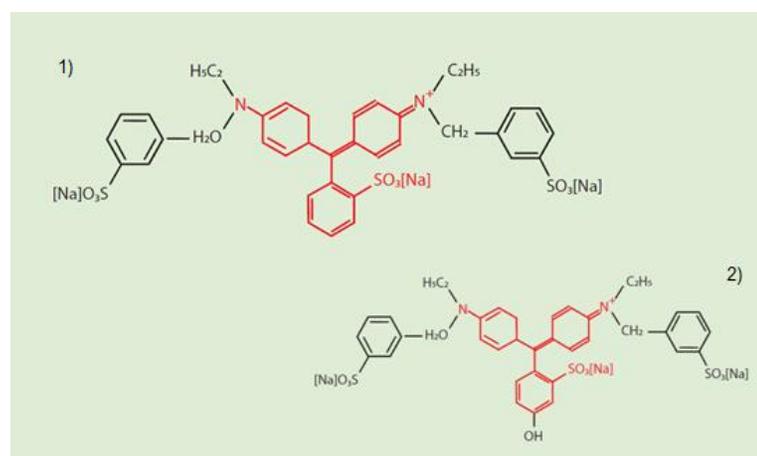


Figura 2. Estrutura química dos corantes 1) Azul Brillhante e 2) Verde Rápido [1, 16].

Tabela 1. Propriedades de alguns corantes utilizados no Brasil.

Nome	Tartrazina	Amarelo Crepúsculo	Azorrubina	Amaranto	Ponceau 4R	Eritrosina	Azul Patente V	Azul Indigotina	Azul Brilhante	Verde rápido	Vermelho 40
Classe	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	xanteno	trifenilmetano	Indigóide	trifenilmetano	trifenilmetano	monoazo
Massa Molar	534,35	452,36	502,42	604,46	604,41	879,86	566,66	466,34	792,84	808,84	496,41
CAS Number	1934-21-0	2783-94-0	3567-69-9	915-67-3	2611-82-7	16423-68	3536-49-0	860-22-0	3844-45-9	2353-45-9	25956-17-6
Código Brasil	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-131	E-132	E-133	E-143	E-129
Absorção	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$	$\lambda_{\max.} =$
Máxima	426 nm	480 nm	515 nm	523 nm	505 nm	526 nm	635 nm	610 nm	629 nm	625 nm	502 nm
IDA (mg/kg											
peso	7,5	2,5	4,0	0,5	4,0	0,1	15,0	5,0	10,0	10,0	7,0
corpóreo)											

3.1.2 Corante da classe dos indigóides

Azul de Indigotina (Figura 3) - Possui baixa estabilidade à luz, calor e ácido, baixa estabilidade oxidativa e descolore na presença de SO_2 e ácido ascórbico. É o único representante dessa classe permitido no Brasil.

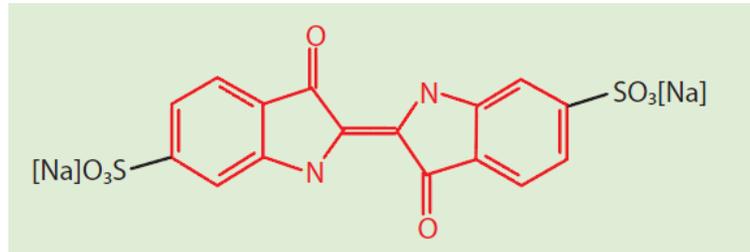


Figura 3. Estrutura química do corante Azul de Indigotina [1, 16].

3.1.3 Corante da classe xanteno

Eritrosina (Figura 4) - Insolúvel em pH abaixo de 5. É o único representante dessa classe permitido no Brasil.

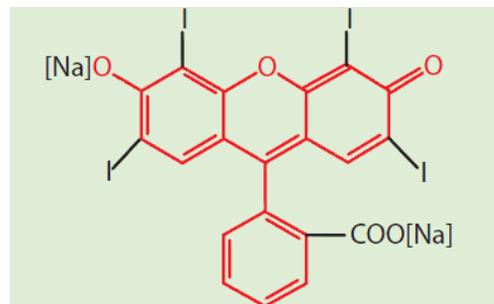


Figura 4. Estrutura química do corante Eritrosina [1, 16].

3.1.4 Corantes azo

Grupo que representa a classe de corantes mais utilizada, compreendendo muitos compostos que apresentam um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo ($\text{N}=\text{N}$), sendo que esses anéis podem conter até três grupos sulfônicos. Os corantes permitidos pela legislação brasileira e pertencentes a este grupo são:

▪ **Amaranto, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo e Azorrubina** (Figura 5) - Esse corante apresenta boa estabilidade à luz, calor e ácido, sendo que os três primeiros podem descolorir em presença de agentes redutores, como o ácido ascórbico e o SO_2 .

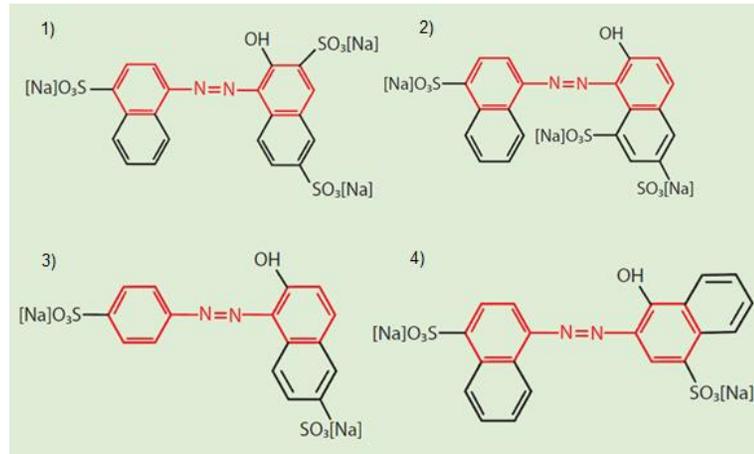


Figura 5. Estrutura química dos corantes 1) Amaranto; 2) Ponceau 4R; 3) Amarelo Crepúsculo e 4) Azorrubina [1, 16].

▪ **Vermelho 40** - A Figura 6 mostra a estrutura deste corante que apresenta boa estabilidade à luz, calor e ácido, além de ser o corante vermelho mais estável para bebidas na presença do ácido ascórbico, um agente redutor.

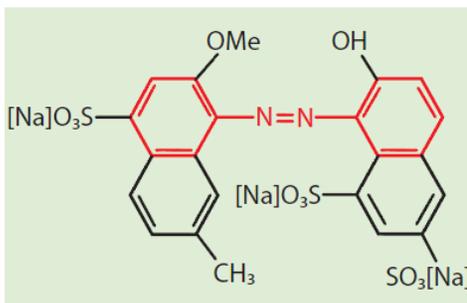


Figura 6. Estrutura química do corante Vermelho 40 [1, 16].

▪ **Tartrazina** - Apresenta excelente estabilidade à luz, calor e ácido, descolorindo em presença de ácido ascórbico e SO_2 . Dentre os corantes azo, a tartrazina tem despertado uma maior atenção dos toxicologistas e alergistas, sendo apontado como o responsável por várias reações adversas, causando desde urticária até asma. Estima-

se que uma em cada 10 mil pessoas apresenta reações a esse corante. No entanto, é um dos corantes mais empregados em alimentos e é permitido em muitos países (Figura 7).

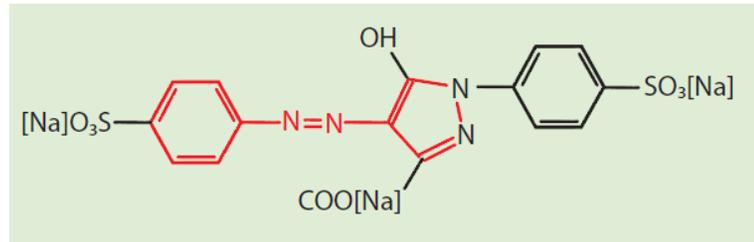


Figura 7. Estrutura química do corante Tartrazina [1, 16].

3.2 Selênio, cromo e cobre

Estes elementos foram escolhidos para o estudo porque esses analitos ou compostos que os contêm são utilizados como catalisadores em etapas prévias da síntese das macromoléculas [13].

Selênio é um elemento encontrado na crosta terrestre em pequenas quantidades, com abundância entre 0,05 e 0,09 mg kg⁻¹, aproximadamente 1 x 10⁻⁵ % da crosta terrestre. Pode ser encontrado em diversos estados de oxidação, como -2 (seleneto), +2, +4 (selenito), +6 (selenato) e 0 (selênio elementar). É um elemento não-metálico, bastante semelhante ao enxofre, que pode ser encontrado como selênio inorgânico e orgânico e é distribuído de maneira desigual em depósitos geológicos.

Aproximadamente metade do selênio produzido industrialmente é utilizado na indústria eletrônica, por conta de suas propriedades semicondutoras. Também pode ser empregado na indústria de vidros, para colorir e descolorir vidros e esmaltes ou na indústria de pigmentos, como catalisador. É utilizado como aditivo em aços na indústria metalúrgica e devido às suas propriedades antioxidantes é utilizado na indústria farmacêutica e para fins medicinais.

Este analito é de grande interesse por ser considerado essencial em nível traço e tóxico em maiores concentrações. As formas inorgânicas de Se são mais tóxicas que as formas orgânicas e sua particularidade é a pequena diferença entre a concentração considerada tóxica e aquela recomendada na dieta alimentar [8, 14, 19].

O cobre compõe cerca de 0,007% da crosta terrestre e é o 25º elemento mais abundante. Metal semi-nobre, é encontrado nos estados de oxidação +1 e +2, sendo que o segundo estado é o mais estável. Uma grande quantidade do cobre extraído industrialmente é usada na fabricação de ligas. O cobre é um dos poucos elementos que desempenha um papel técnico importante quando puro, principalmente na indústria elétrica.

O Cu é utilizado em ferros de soldar, aços e bobinas de aquecimento e refrigeração, devido à sua excelente condutividade térmica. Por causa das suas propriedades fungicidas, os sais de Cu são usados desde os tempos antigos para a proteção de plantações e como conservante da madeira.

O cobre também é um elemento essencial para humanos, em baixas concentrações, e tóxico em concentrações maiores, apresentando essencialidade para numerosas plantas, sendo um constituinte das proteínas com atividade enzimática. Como este analito tem a característica de se acumular nos órgãos, o fígado, por exemplo, quando exposto a grandes quantidades de Cu em períodos de tempo relativamente grandes, perde suas funções e pode parar de funcionar, levando à morte [8, 14, 20].

Cromo está presente na crosta terrestre em aproximadamente 0,02% de abundância, portanto, é um dos elementos mais comuns. Metal branco com comportamento semelhante ao do molibdênio e tungstênio. Este elemento pode se apresentar nos estados de oxidação de -2 a +6, dependendo sempre de vários fatores, como a cinética de reação, potenciais de redução e também o pH do meio.

Desde a antiguidade, compostos contendo cromo eram utilizados como pigmentos, sendo que o metal só passou a ter importância industrial no fim do século XIX. Este metal é principalmente utilizado na produção de ligas metálicas e, quando combinado ao ferro, confere ao aço alta dureza e resistência ao ataque químico, sendo um dos principais constituintes do aço inoxidável. Por ser bastante resistente a reagentes corrosivos comuns, o cromo é utilizado também em revestimentos, sendo eletrodepositado sobre outros metais, formando assim, uma camada protetora (cromaço). Por alguns de seus compostos possuírem características refratárias, é utilizado como material refratário e na produção de rubis sintéticos para laser. É

utilizado também no curtimento do couro, como preservativos para madeiras e fungicidas.

Cr^{3+} é um elemento essencial em nível traço e desempenha um importante papel no metabolismo da glicose. Compostos contendo Cr^{6+} são tóxicos em qualquer concentração, especialmente o óxido e cromatos de metais alcalinos [8, 14, 21].

3.3 Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Em 1955, Alan Walsh propôs uma técnica para determinações elementares, chamada espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). Esta nova técnica fazia uso de uma chama para produzir o vapor atômico e possibilitar a absorção da radiação pelo analito presente nessa chama e, assim, a sua quantificação. Depois de diversos pesquisadores perceberem a dificuldade da atomização de analitos refratários nessa chama, Boris L'vov propôs utilizar um forno de grafite aquecido como meio de atomização, mas esta idéia só foi colocada em prática em 1967 por M. Massmann e, então, a ET AAS foi concretizada [8, 22].

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GF AAS) é muito usada para a determinação de elementos traço, é bastante adequada devido a sua seletividade, sensibilidade e possibilidade da introdução da amostra com pouca ou nenhuma manipulação prévia e tem sido amplamente usada para a análise de matrizes diversas. Sabe-se que matrizes complexas podem prejudicar o desempenho da análise em Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), mas com a atomização eletrotérmica em forno de grafite, geralmente ocorre a eliminação completa da matriz antes da atomização do analito, sendo esta a principal vantagem da técnica de GF AAS em relação a da FAAS, por exemplo [8, 23].

Em GF AAS ocorrem quatro etapas básicas: a etapa de secagem, na qual ocorre a evaporação do solvente da amostra; a pirólise, responsável pela eliminação da matriz, com conseqüente eliminação dos concomitantes; a atomização, que é a etapa na qual ocorre a formação da nuvem atômica do analito e a leitura da absorbância. A última etapa é a de limpeza, com temperaturas mais elevadas que as de atomização, visando

deixar o ambiente do forno sem quaisquer resquícios de amostra ou analito para a próxima replicata da análise [8, 23].

Ao longo dos anos vários avanços têm contribuído para o desenvolvimento da AAS, como, por exemplo, a câmara de pré-mistura acoplada aos queimadores dos espectrômetros de chama ou a introdução do conceito STPF - *stabilized temperature platform furnace*. Também foram desenvolvidas pesquisas e aplicações de novas fontes de radiação como as lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL – *Electrodeless Discharge Lamp*), lâmpadas de cátodo oco (HCL – *Hollow Cathode Lamp*) e o uso de laser de diodos [8, 22].

Em decorrência das melhorias obtidas ao longo do tempo, a técnica GF AAS passou a ser bastante utilizada para a determinação de elementos traço em amostras mais complexas com pouca ou nenhuma manipulação prévia da amostra, o que não era possível pela técnica FAAS.

3.3.1 Conceito STPF

Em GF AAS, o número de variáveis que determinam a sua eficiência tornou-se significativamente menor após a introdução do conceito STPF. As condições STPF são um conjunto de requisitos instrumentais e operacionais (Tabela 2) que asseguram uma condição analítica adequada, que permite obter métodos mais sensíveis e com interferências mínimas [8, 19, 22, 24].

Tabela 2. Requisitos instrumentais e operacionais necessários às condições STPF.

Condições STPF	Resultado Obtido
Tubo de grafite com plataforma de L'vov	Garantia de que a matriz e o analito não estarão em temperaturas mais altas de que o tubo de grafite e o g
Sinais de absorvância registrados em área	Minimização dos efeitos das variações cinéticas do processo de atomização
Atomizador com grafite pirolítico	Diminuição das perdas por difusão através da parede do atomizador
Tubo de grafite com aquecimento transversal	Estabelecimento de um ambiente espacialmente isotérmico
Correção de fundo por efeito de Zeeman	Correção das interferências espectrais
Uso de modificador químico	Aumento da eficiência do tratamento térmico durante a pirólise
Interrupção do fluxo de gás durante a atomização	Aumento do tempo de permanência da nuvem atômica na zona de observação
Elevada taxa de aquecimento do tubo de grafite	Diminuição das interferências na fase de vapor e formação de uma nuvem atômica densa

3.3.2 Modificadores químicos

Mesmo com a introdução do conceito STPF e as vantagens em relação à FAAS, como a atomização quase integral da amostra, melhorando os limites de detecção, em GF AAS o analito ainda pode ser perdido na etapa de pirólise ou na de atomização, devido à presença de concomitantes da amostra ainda não eliminados. Entretanto, é possível melhorar o desempenho da técnica fazendo uso de uma modificação química eficiente e, assim, aumentar a estabilidade térmica do analito e/ou a volatilização da matriz, eliminando interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra [8, 25]. Os modificadores químicos devem apresentar as seguintes características:

- Estabilizar o analito em temperaturas de pirólise elevadas para garantir a total eliminação da matriz na etapa de pirólise;
- Não diminuir o tempo de vida do tubo de grafite ou da plataforma;
- Ser utilizado em alto grau de pureza para evitar valores altos de branco;
- Não ser usualmente determinado por ET AAS;
- Não diminuir a sensibilidade da técnica;
- Apresentar mínima contribuição para a absorção de fundo;
- Ser o mais universal possível, ou seja, estabilizar uma grande variedade de elementos, facilitando procedimentos de rotina

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

A superfície da plataforma e/ou as paredes do tubo podem ser modificadas de três maneiras, sendo bastante utilizada a deposição térmica, na qual o modificador é introduzido no forno e submetido ao programa de temperatura do mesmo. Entretanto, é esse tipo de procedimento deve ser feito com cautela, uma vez que esse tipo de modificação pode não recobrir totalmente a superfície da plataforma [8, 25, 26].

Geralmente, o fabricante do equipamento sugere programas de aquecimento e o modificador a ser utilizado para cada elemento, mas dependendo da complexidade da matriz é necessário um estudo mais aprofundado envolvendo o programa de temperatura, os modificadores químicos e o tratamento da amostra.

Considerando a dificuldade de obtenção de métodos adequados para a determinação dos analitos de interesse em corantes alimentícios, foi feita uma busca sobre trabalhos com Se, Cr e Cu na literatura. A determinação de Se por GF AAS, em diversas matrizes, mostra a dificuldade de utilizar uma curva de calibração externa, necessitando o uso de modificador químico e da técnica de adição de analito ou ajuste de matriz (*matrix-matching*). Lima *et al.* avaliaram o uso da plataforma modificada com W-Ir para a determinação de Cd, Pb e Se em materiais de referência, a qual se mostrou mais eficiente que os modificadores fosfato de amônio, nitrato de magnésio e paládio

[27]. Rosa *et al.* investigaram $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, Pd pré reduzido, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ como modificadores para a determinação de Se em vegetais, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o modificador puro $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ [28]. Para a determinação de Se em solos, Rosa *et al.* usaram W como modificador permanente e obtiveram recuperações de 80 a 90% para o método, além de aumentar significativamente a vida útil do tubo para 750 queimas [29]. Theodorolea *et al.* estudaram Zr, Ir bem como a mistura Zr-Ir para a determinação de Se em leite humano e obtiveram os melhores resultados com a combinação de 2 μg Zr-2 μg Ir [30]. González-Nieto *et al.* descreveram o efeitos de Pd, Ni e diferentes misturas desses dois modificadores para a determinação de Se em solos e mostraram que todas as combinações testadas levaram a resultados precisos e boa detectabilidade [31]. Sousa *et al.* estudaram a determinação de Se em adoçantes líquidos na ausência de modificador químico e na presença de $\text{Pd}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, obtendo os melhores resultados na presença do modificador, com recuperações de 94 a 108% e baixos desvios [32]. Bertelsmann *et al.* determinaram Se em esperma utilizando Pd como modificador químico [33], enquanto leggli *et al.* desenvolveram um método para a determinação de Se em ovos usando Pd como modificador químico e obtiveram boa precisão e exatidão nas análises [34]. Por outro lado, Shrivastava *et al.* usaram Ir como modificador para a determinação de Se em amostras de vegetais e de frutas e obtiveram baixos desvios para o método [35].

Em contraste, a determinação de Cr e de Cu em diversas matrizes, não mostra uma dificuldade tão grande, mas em alguns trabalhos também é necessário o estudo de modificadores para a determinação destes analitos em matrizes mais complexas. Daftsis *et al.* estudaram o desempenho analítico de GF AAS para a determinação de Cd, Co, Cr e Pd em frações de sangue, mas por ser uma amostra muito complexa a calibração interna teve que ser utilizada, além de ser necessária a utilização de modificador químico [36]. Dobrowolski fez a determinação de Ni e Cr em solos usando GF AAS, sendo que a determinação de Ni só foi possível com a técnica de adição de analito (calibração interna); já o Cr pôde ser determinado sem grandes dificuldades utilizando uma curva de calibração externa [37]. Felipe-Sotelo *et al.* usaram GF AAS para fazer a determinação de Cr, Ni e V em matrizes complexas, sendo que os três analitos puderam ser determinados com precisão [38]. Lobo *et al.* fizeram a

comparação entre otimização univariada e multivariada para a determinação de Cu, Pd, Ni e Cd em biodiesel por GF AAS e os resultados comprovaram que a análise multivariada pode ser uma poderosa ferramenta para otimizar condições experimentais em GF AAS [39]. Acar estudou a determinação de Cd, Cu e Pd em amostras de solo, sedimentos e água do mar por GF AAS usando Sc + Pd + NH_4NO_3 como modificador químico e comprovou que o mesmo pode ser utilizado para a determinação dos três analitos [11]. Kiliç *et al.* fizeram a determinação de Pb e Cu em goma de mascar por FAAS e GF AAS usando vários modificadores químicos e obtiveram bons resultados para ambas as técnicas, sendo que as interferências de matriz foram controladas em GF AAS com a correção de fundo pelo efeito Zeeman e o uso de W + Pd como modificador químico [40].

3.4 Tratamento da amostra

Depois da escolha da técnica a ser utilizada, é feita a seleção do procedimento de preparo de uma amostra, sendo que a escolha correta é de extrema importância em diversas técnicas de análise e também para a obtenção do sucesso de uma metodologia analítica. Em quase toda análise química é necessário que as amostras sejam submetidas a algum tipo de tratamento, para que possam ser analisadas pela técnica selecionada, sempre buscando métodos simples, de baixo custo, com menor manipulação da amostra e evitando perigos de contaminação da amostra e do analista.

Esses tratamentos podem envolver a solubilização ou a decomposição da amostra. Os tratamentos por solubilização envolvem a adição de reagentes adequados para a dissolução da amostra, que nem sempre precisa sofrer uma reação química. Por outro lado, no tratamento por decomposição podem ocorrer algumas transformações químicas da amostra, que pode ser levada a oxidação por completo, deixando as espécies de interesse em formas inorgânicas mais simples e menos voláteis, facilitando, assim, a análise [41, 42, 43].

Todas as amostras podem ser submetidas a processos de tratamento, se a técnica de análise exigir e se a não houver perdas do analito ou diluições que comprometam a análise. Mesmo amostras líquidas podem necessitar de um preparo

prévio antes de serem analisadas. Sendo assim, a maneira de se decompor uma amostra depende fortemente do analito a ser determinado, de sua concentração, da exatidão e precisão desejadas e também do método empregado para a análise [41, 42, 43].

No presente trabalho, foram utilizados três tipos de tratamento de amostra, isto é, mineralização ácida assistida por radiação de micro-ondas, utilização de banho de ultrassom e dissolução ácida.

3.4.1 Mineralização ácida assistida por radiação de micro-ondas (MW)

Quando o analito deve estar na forma livre, a mineralização ácida é exigida, possibilitando, então, a análise. Esse tipo de tratamento, sem ajuda da radiação de micro-ondas, exige bastante trabalho e tempo, comprometendo a freqüência analítica, sendo que esse tipo de procedimento também pode levar a perdas do analito e/ou contaminações. Por outro lado, a utilização da radiação de micro-ondas como fonte de energia para a mineralização de amostras possibilitou rapidez na análise de amostras complexas, evitando as perdas de analitos voláteis e eventuais contaminações de amostras. Abu-Samra *et al.* foram os primeiros a descrever o uso dessas radiações como fonte de energia para promover a dissolução de amostras, utilizando um forno de microondas[41, 42, 43, 44].

As radiações de micro-ondas são não-ionizantes e provocam o movimento das espécies em solução, tanto pela migração de íons, quanto pelas rotações de dipolo, sendo necessária a existência de moléculas polares no conteúdo levado ao forno de micro-ondas. Esses eventos são causados pela rápida alternância do campo eletromagnético, por exemplo, em um forno de micro-ondas caseiro, isso ocorre $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo. Sendo assim, esse mecanismo de *stress* induzido pela interação das micro-ondas com as moléculas, leva ao aquecimento da solução da amostra [41, 42, 43].

As micro-ondas possuem freqüências entre 300 e 300.000 MHz. Dentre elas, a freqüência de 2450 ± 13 MHz é a mais comum e é a usada nos fornos de micro-ondas caseiros. A energia que, geralmente, um sistema de micro-ondas irradia é de 600 - 700

W. Sendo assim, um forno de micro-ondas para preparo de amostra pode fornecer, em aproximadamente cinco minutos, uma energia próxima de 43 kcal [41, 42, 43].

Não é novidade a extensa utilização de fornos de micro-ondas para preparo de amostras. Apesar de, nos últimos anos, muitas outras estratégias, tanto para o tratamento de amostra quanto para a introdução de amostras com quase nenhum preparo, virem ganhando espaço nos laboratórios, a utilização da radiação de micro-ondas ainda é bastante difundida e, muitas vezes, seus resultados servem como referência para a aceitação daqueles obtidos por outros métodos.

Sousa *et al.* utilizaram a radiação de micro-ondas para o preparo de amostras de adoçantes líquidos para a determinação de Ca, Cd, Co, Cu, K, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se e Zn por ICP-OES e ICP-MS. As amostras (1 g) foram digeridas com 10 mL de HNO₃ e o 8 mL de H₂O₂. Os autores comprovaram que as duas técnicas permitem a avaliação da composição inorgânica e a determinação rápida dos analitos, uma vez que as recuperações para os dois métodos ficaram entre 90 - 110% e os desvios padrão foram menores que 12% para ICP OES e 14% para ICP MS [45].

Krachler *et al.* utilizaram a mineralização ácida assistida por radiação de micro-ondas como tratamento de amostras de turfas ombrotóricas para a determinação de As por HG-AAS e ICP-SF-MS. A digestão das amostras foi feita com 0,1 mg das turfas e 3 mL de HNO₃. Os autores obtiveram concordância nos valores de As em materiais certificados e confirmaram que a mineralização assistida por radiação de micro-ondas usando ácido nítrico foi adequada e eficaz para a dissolução das amostras de turfa para a determinação de As. Além disso, os autores deixaram claro que é desnecessária utilização de HBF₄ ou HF, geralmente adicionados a amostras contendo silicatos [46].

Gonçalves *et al.* estudaram a determinação de Pt, Pd e Rh em gases de escape de veículos por GF AAS e ICP OES, utilizando a mineralização ácida assistida por radiação de micro-ondas como tratamento das amostras, que foram coletadas em filtros posicionados na saída de gases do carro. Esses filtros foram submetidos a mineralização, utilizando um forno de micro-ondas caseiro modificado e 20 mL de água régia, por 10 minutos. A solução resultante foi filtrada, avolumada a 100 mL e mantida sob refrigeração até o momento da análise. Os autores obtiveram um método simples e

barato para a determinação dos analitos, mostrando que os veículos que utilizam catalisadores emitem, juntamente com os gases de combustão, Pt, Pd e Rh para a atmosfera [47].

Shah *et al.* fizeram a mineralização de amostras de tecidos musculares de peixe em forno de micro-ondas e posterior determinação de As total, As^{3+} e As^{5+} por ET AAS. Para a determinação de As total, 0,2 g das amostras foram mineralizadas com 2 mL de uma mistura $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (2:1 v/v). Já a mineralização para a especiação de As foi feita com 0,5 g de amostras liofilizadas, 5 mL de HClO_4 e 50 mg de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Os autores obtiveram concordância nos resultados obtidos pelo método proposto com os valores certificados das espécies de As no material de referência. Sendo assim, o método desenvolvido mostrou-se adequado para a especiação de As^{3+} e As^{5+} e quantificação de As total [48].

3.4.2 Solubilização em banho de ultrassom (US)

O banho de ultrassom utiliza ondas mecânicas com velocidades muito grandes e que podem auxiliar na solubilização da amostra ou dispersão das partículas sólidas da amostra em um solvente. Estas ondas são de frequências maiores que as audíveis para o ser humano, sendo acima de 16 kHz. As ondas ultrassônicas se propagam através da matéria, com uma velocidade que pode variar desde centenas de metros por segundo no ar, até milhares de metros por segundo em sólidos, sendo que na água e em soluções aquosas diluídas, a velocidade pode chegar a 1500 m/s [41, 49].

As ondas sonoras sempre existiram como qualquer onda mecânica, mas somente em 1927 foram percebidos alguns efeitos das ondas ultrassônicas em sistemas químicos e biológicos. Apenas depois da evolução da tecnologia para fabricação de aparelhos geradores dessas ondas é que o seu efeito sobre sistemas químicos pôde ser estudado e utilizado em procedimentos de preparo de amostra [41, 49].

Estas ondas ultrassônicas produzem cavitação acústica quando passam através de um meio líquido. A cavitação é a formação e implosão de micro bolhas de gás no interior de um líquido, provocando transformações químicas, como a extração ou dissolução de espécies químicas presentes em amostras sólidas. Também pode ocorrer

a oxidação ou redução da matriz, devido a altas temperaturas associadas a liberação de grandes quantidades de energia da interação ondas/líquido, pois, com essas interações, há formação de espécies responsáveis por essas reações de oxidação-redução [41, 49].

Nos últimos anos, o banho de ultrassom é utilizado como procedimento para tratamento de uma variedade de matrizes, mostrando eficiência para o preparo das amostras que contêm elementos traço. Esta técnica vem sendo amplamente reconhecida por possuir a vantagem de evitar métodos destrutivos como a calcinação ou procedimentos de digestão ácida [50, 51].

Lavilla *et al.* fizeram a extração assistida por ultrassom de As, Se, Ni e V em amostras de peixes e mariscos com posterior análise por ET AAS, obtendo um método rápido, preciso e simples para quantificar os analitos nessas amostras, quando é feita a comparação com a mineralização ácida. Os autores comprovaram que este tipo de procedimento é mais seguro e menos dispendioso, pois pode ser feito com o consumo mínimo de ácidos e menor manipulação da amostra [51].

Shrivastava *et al.* desenvolveram um método para a determinação de selênio em vegetais e frutas, utilizando a micro extração em fase líquida com fibras ocas, sendo que a extração foi assistida por ultrassom (UA-HF LPME) e a quantificação foi feita por GF AAS. Os autores obtiveram um método simples, rápido e altamente sensível para a determinação do analito em diferentes tipos de amostras de vegetais e de frutas. Os valores de recuperação obtidos revelaram que este processo de extração é pouco afetado pela matriz da amostra, ou seja, o método de extração se mostrou tão eficiente quanto um método de mineralização ácida [35].

Capelo *et al.* propuseram um método para extração sólido-líquido de Cu em suspensões de tecidos de mexilhões utilizando sonda ultrassônica de alta intensidade e quantificação por ET AAS. Os autores obtiveram um método simples e rápido para a quantificação do analito, pois as amostras foram pesadas diretamente no amostrador automático. A adição do ácido utilizado para a extração por sonicação também foi feita diretamente no amostrador, no momento da análise, diminuindo assim a quantidade de erros volumétricos e de sedimentação da suspensão da amostra [52].

Santos *et al.* desenvolveram um método para a determinação de Cd, Cr, Pb e Sb em suspensões de amostras de plásticos proveniente de material elétrico-eletrônico por ET AAS, utilizando o reagente dimetilformamida e banho de ultrassom como procedimento de preparo da amostra. A utilização deste reagente com a sonicação das amostras resultou em um procedimento rápido e simples. Os estudos de adição e recuperação indicaram que o método desenvolvido pode ser aplicado para a determinação de Cd, Cr, Pb, e Sb nesse tipo de amostra [53].

3.4.3 Métodos simples para a introdução da amostra - dissolução ácida (DA)

Como já mencionado, a maior parte dos métodos utilizados para a determinação de elementos traço, requer manipulação da amostra, envolvendo procedimentos de digestão com ácidos em frascos abertos ou fechados. A fim de diminuir ou eliminar procedimentos prévios, estão sendo desenvolvidos métodos que fazem a introdução direta ou com o mínimo de manipulação possível da amostra.

Puig *et al.* investigaram quatro procedimentos de preparo de amostra para a determinação de platina em catalisadores automotivos por GF AAS. Os autores estudaram os métodos de digestão convencionais e por forno de micro ondas, ambos com água régia, fusão alcalina com metaborato de lítio e suspensão aquosa. Os autores afirmaram que os quatro procedimentos podem ser utilizados para a dissolução dos substratos dos catalisadores para a determinação de Pt. Contudo, o procedimento de mineralização ácida, além de ser mais trabalhoso não ofereceu a dissolução total da amostra. Por outro lado, a fusão alcalina forneceu soluções límpidas, sem resíduos sólidos, mas é um processo lento e requer cadinhos de grafite de alto custo. Já a introdução de suspensões aquosas usando Triton X-100 mostrou-se uma alternativa válida para a determinação do teor do analito nesse tipo de amostra, pois apresentou precisão e exatidão aceitável, não apresentou efeito de matriz, além de ser um procedimento muito menos demorado e custoso que os demais [54].

Santos *et al.* fizeram a determinação simultânea de Cd e Fe em grãos utilizando amostragem direta de sólidos e determinação por HR-CS ET AAS. Os autores conseguiram um método rápido, para determinar simultaneamente os analitos nesse tipo de amostra, com desvios relativos de 3 a 7 % para Cd e 4 a 13% para Fe, justificando os desvios maiores para o Fe pelo fato de estar quase sempre presente em todos os tipos de amostras ambientais. A exatidão do método foi avaliada através da análise três CRM de composições diferentes, usando ambas as curvas de calibração, com padrões aquosos e com padrões sólidos. Os resultados confirmaram que não há diferença significativa entre as duas técnicas de calibração, de acordo com o teste t de Student em um nível de confiança de 95% [55].

Castilho *et al.* avaliaram três diferentes procedimentos para o preparo de amostras visando a determinação de Cu, Mo e Sb por HR-CS AAS em material particulado no ar, coletado em filtros de fibra de vidro. Os autores compararam o desempenho obtido com a amostragem direta de sólidos, a mineralização em forno de micro-ondas e a sonicação usando água régia. Os resultados da amostragem direta de sólidos apresentaram concordância com os obtidos a partir da digestão ácida assistida por micro-ondas, com exceção do molibdênio, bem como com os resultados obtidos pelo método de extração utilizando banho de ultrassom. A amostragem direta de sólidos apresentou uma clara vantagem, pois o método não requer a utilização de qualquer quantidade de ácidos tóxicos e/ou corrosivos e não produz qualquer resíduo perigoso [56].

É importante salientar que muitos dos trabalhos envolvendo a amostragem direta de sólidos ou outras estratégias mais simples de introdução de amostras utilizam técnicas de análise mais modernas, como HR-CS GF AAS. Assim, há ainda muita pesquisa a ser feita, para amostras ainda não estudadas, visando a simplificação do tratamento de amostras para análise usando técnicas mais comuns, como por exemplo, LS GF AAS.

Desta forma, este trabalho foi desenvolvido tendo em vista a obtenção de um método que utilize o menor número de etapas no preparo da amostra, como por exemplo, a dissolução ácida, que consiste apenas na adição de ácidos diluídos na amostra de interesse e posterior introdução no equipamento.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação

Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA; modelo AAnalyst 600), com corretor de fundo baseado no efeito Zeeman, amostrador automático (modelo AS-800), tubos de grafite com aquecimento transversal e plataforma de L'vov integrada. A fonte de radiação utilizada foi a lâmpada de descarga sem eletrodo para Se (EDL, Perkin Elmer), operando a 290 mA, no comprimento de onda de 196,0 nm e, para Cr e Cu, lâmpadas de catodo oco (HCL, Perkin Elmer), operando a 25 mA, nos comprimentos de onda de 357,9 nm e 324,8, respectivamente. A vazão de argônio como gás de purga foi de 250 mL min⁻¹. Esse gás foi interrompido durante a etapa de atomização. Utilizou-se integração dos sinais para eliminar erros de leitura causados por efeitos cinéticos que possam ocorrer durante a atomização. Os volumes de amostra e de modificador químico injetados no tubo de grafite foram de 20 µL e 5 µL, respectivamente. Para o estudo multivariado das condições do equipamento e de modificadores químicos, foi utilizado o programa *Statística 7.0* para a criação dos planejamentos experimentais e para a análise dos dados obtidos nos planejamentos.

4.2 Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Água deionizada (resistividade de 18.2 MΩ cm) foi obtida com um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido nítrico e peróxido de hidrogênio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os recipientes de amostra, copos do amostrador automático e outros materiais, foram lavados com água e mergulhados em 10% v/v ácido nítrico 10% v/v (Merck), por 24 horas, e enxaguados com água deionizada antes do uso.

As soluções estoque de Se, Cr e Cu (1000 mg L⁻¹), foram preparadas a partir da diluição das ampolas dos sais dos elementos (Titrisol, Merck) com HNO₃ 2% v/v (Merck, Darmstadt, Alemanha) previamente destilado. Padrões analíticos com concentrações

entre 2 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparados a partir destas soluções utilizando 0,2% a 15% m/v HNO_3 .

Os modificadores químicos foram preparados a partir de soluções de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 10.000 mg L^{-1} em HNO_3 15% v/v (Perkin Elmer) e de $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 10.000 mg L^{-1} em HCl 20% v/v (VHGLABS, Manchester, EUA). Sólidos de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Acros, New Jersey, EUA), $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ecibra, Santo Amaro, Brasil), AgNO_3 (Avi-Cenna, Guarulhos, Brasil) e $(\text{NH}_4)_6\text{W}_7\text{O}_{24} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, São Paulo, Brasil).

4.3 Procedimentos para o tratamento das amostras

Três procedimentos para o tratamento da amostra, listados a seguir, foram avaliados, utilizando os corantes alimentícios: Tartrazina (E-102, BASF), Amarelo crepúsculo (E-110, BASF), Amaranto (E-123, BASF), Ponceau 4R (E-124, BASF) e Indigotina (E132, BASF). Para a aplicação dos métodos foram utilizados os corantes: Tartrazina (E-102, BASF), Amarelo crepúsculo (E-110, BASF), Indigotina (E132, BASF), Eritrosina (E-127, BASF) e Vermelho 40 (E-129, BASF).

4.3.1 Mineralização via MW

O estudo da mineralização foi feito com o corante E-132. Em frascos para forno de micro-ondas (Teflon[®]), pesou-se aproximadamente 0,1 g (para Se e Cr) e 0,5 g (para Cu) do corante e adicionaram-se 6 mL de HNO_3 concentrado, 1 mL de H_2O_2 e 4 mL de H_2O deionizada e, a seguir, foram adicionados padrões de Se, Cr e Cu. Essas misturas foram preparadas em triplicata, sendo submetidas ao programa de aquecimento do forno de micro-ondas (Milestone, modelo ETHOS), descrito na Tabela 3. Em seguida, foram colocadas em tubos para centrifugação (*falcon*) e avolumadas para 40 mL, resultando em soluções com a concentração de 2,5 g L^{-1} do corante para Se e Cr e 12,5 g L^{-1} para Cu, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu. As medidas foram feitas com a condição *default* de forno de grafite (pré-estabelecido pelo fabricante do equipamento), Tabela 4, usando a mistura Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg como modificador químico para Se e Cu e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 15 μg para Cr.

Tabela 3. Programa utilizado no forno de microondas para digestão de amostras de corante alimentício.

Etapa	t (min)	E (W)	T (°C)	P(bar)
1	6	1000	80	45
2	4	1000	80	45
3	3	1000	120	45
4	5	1000	120	45
5	10	1000	180	45
6	15	1000	180	45

Tabela 4. Programa inicial de aquecimento do forno de grafite (a partir deste programa as temperaturas de pirólise e de atomização foram variadas).

Etapa	Temperatura (°C)			Rampa (s)	Sustentação (s)	Vazão de Ar (mL min ⁻¹)
	Se	Cr	Cu			
Secagem 1	110 ^a	110	110 ^a	1 ^f	20	250
Secagem 2	130 ^b	130	130 ^b	15	30	250
Pirólise	1300 ^c	1500 ^c	1200 ^c	10	20	250
Atomização	1900 ^d	2300 ^d	2000 ^d	0	5	0
Limpeza	2450	2450 ^e	2450	1	3	250

^a temperatura alterada para 90 °C; ^b temperatura alterada para 120 °C; ^c e ^d variáveis estudadas; ^e temperatura alterada para 2600 °C, ^f tempo alterado para 10 s.

4.3.2 Extração via US

O estudo utilizando banho de ultrassom (Uniqui, modelo USC 1400) foi feito com o corante E-132. Em *falcon*s foram preparadas soluções em HNO₃ 10% m/v para Se e 0,4% m/v para Cr e Cu, utilizando a mesmas concentrações do corante e do analito

descritas na mineralização, sendo que as amostras foram submetidas a esse tratamento por 10 minutos. As medidas foram feitas com a condição *default* do equipamento, usando os modificadores já descritos anteriormente.

4.3.3 Dissolução ácida

O termo “dissolução ácida” está descrevendo neste trabalho um método de preparo da amostra no qual o corante é dissolvido em soluções de HNO_3 e em seguida a amostra é introduzida no equipamento. Foram preparadas soluções, em triplicata, do corante E-132 e de um padrão aquoso contendo 0,2%, 0,4%, 5,0%, 10% e 15% m/v em HNO_3 para Se e 0,4 % m/v em HNO_3 para Cr e Cu, sendo que um estudo comparativo da melhor concentração de ácido e entre os três métodos de preparo da amostra foi feito para Se, utilizando as mesmas concentrações do corante e do analito já apresentadas, bem como as condições para as medidas. O preparo de amostra para Cr e Cu também foi avaliado por meio da comparação deste método e dos métodos descritos anteriormente. Todos os estudos posteriores foram feitos com as amostras preparadas a partir deste método. Para o estudo de modificadores químicos e temperaturas de pirólise e de atomização, a quantidade adicionada de Se nas amostras foi de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e para Cr e Cu, $10 \mu\text{g L}^{-1}$. As medidas foram feitas com a condição *default* do equipamento, usando os modificadores já descritos anteriormente.

4.4 Modificador químico

Os modificadores estudados para Se foram: Pd 5 μg ; Ni 50 μg ; Ag 50 μg ; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 300 μg ; Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg ; Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 30 μg ; Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 90 μg ; Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}$ 180 μg ; Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 270 μg ; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 30 μg /Pd 15 μg ; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 30 μg /Pd 30 μg ; Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Ni}$ 50 μg ; Ag 25 $\mu\text{g}/\text{Ni}$ 25 μg ; W termicamente depositado 200, 300 (como descrito na Tabela 5) e 250 μg (usando um método de deposição descrito na literatura para a determinação de Se em solos, descrito na Tabela 6) [27]; W 250 μg + Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 90 μg ; W 200 μg + Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Ni}$ 50 μg ; Ir termicamente depositado 520 μg (usando um método de deposição encontrado na literatura para a determinação de

As em sedimentos, carvão e cinzas, Tabela 7) [57]; Ir 520 μg + Pd 5 μg /Mg(NO₃)₂ 3 μg ; Ir 520 μg + Pd 5 μg /Ni 50 μg e Pd 5 μg /Mg(NO₃)₂ 3 μg + H₂O₂ 20%, 40% e 60% v/v adicionado à solução da amostra

Para Cr foi utilizado o modificador Mg(NO₃)₂ 15 μg e para Cu Pd 5 μg /Mg(NO₃)₂ 3 μg .

Tabela 5. Sequência empregada para o 1º procedimento de revestimento da plataforma integrada com tungstênio.

Etapa	Procedimento
1	Pipetar 50 μL de W 1 g L ⁻¹ na plataforma.
2	Executar quatro vezes o seguinte programa de aquecimento ^a (rampa, sustentação): 120 °C(10, 25s), 600 °C(30, 30s), 1800 °C(20, 5s), 2200 °C(10, 5s), 2600°C(5, 3s).
3	Repetir as etapas 1 e 2 mais três vezes (construção das curvas de pirólise e atomização para 200 μg de W).
4	Repetir as etapas 1 e 2 mais duas vezes (construção das curvas de pirólise e atomização para 300 μg de W).

^a Todas as etapas dos programas de aquecimento foram realizadas com fluxo de argônio de 250 mL min⁻¹.

Tabela 6. Sequência empregada para o 2º procedimento de revestimento da plataforma integrada com tungstênio.

Etapa	Procedimento
1	Pipetar 50 μL de W 1 g L ⁻¹ na plataforma.
2	Executar quatro vezes o seguinte programa de aquecimento ^a (rampa, sustentação): 120 °C(5, 25s), 150 °C(10, 60s), 600 °C(20, 15s), 1000 °C(10, 15s).

3	Repetir as etapas 1 e 2 mais três vezes.
4	Repetir a etapa 1 e correr o seguinte programa de aquecimento (rampa, sustentação): 120 °C(5, 25s), 150 °C(10, 60s), 600 °C(20, 15s), 1000 °C(10, 15s), 1400 °C(10, 5s), 2000°C(3, 2s).
5	Executar o seguinte programa de aquecimento (rampa, sustentação): 150 °C(1, 10s), 600 °C(10, 15s), 1100 °C(10, 5s), 1400 °C(10, 10s).
6	Executar o seguinte programa de aquecimento (rampa, sustentação): 150 °C(1, 10s), 600 °C(10, 15s), 1100 °C(10, 5s), 1400 °C(10, 10s), 1500 °C(3, 5s), 1600 °C(1, 1s), 1700 °C(1, 1s), 1800 °C(1, 1s), 1900 °C(1, 1s), 2000 °C(1, 1s).

^a Todas as etapas dos programas de aquecimento foram realizadas com fluxo de argônio de 250 mL min⁻¹.

Tabela 7. Sequência empregada para o procedimento de revestimento da plataforma integrada com irídio.

Etapa	Procedimento
1	Pipetar 40 µL de Ir L ⁻¹ na plataforma.
2	Executar uma vez o seguinte programa de aquecimento ^a (rampa, sustentação): 110 °C (10, 50s), 160(30, 50s), 160(0, 6s), 1000(50, 10s), 2000(50, 5s).
3	Repetir as etapas 1 e 2 mais doze vezes (construção das curvas de pirólise e atomização para 520 µg de Ir).

^a Todas as etapas dos programas de aquecimento foram realizadas com fluxo de argônio de 250 mL min⁻¹.

4.5 Otimização das condições de trabalho

4.5.1 Otimização univariada

A otimização univariada foi feita para todos os modificadores estudados, para os três analitos e com o corante E-132 na concentração de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ para Se e Cr e $12,5 \text{ g L}^{-1}$ para Cu. O estudo do tratamento da amostra foi realizado por meio da leitura das amostras preparadas a partir de cada tratamento descrito anteriormente, mantendo as temperaturas de pirólise e atomização constantes, utilizando o modificador Pd $5 \mu\text{g}$ /Mg(NO₃)₂ $3 \mu\text{g}$ para Se e Cu e Mg(NO₃)₂ $15 \mu\text{g}$ para Cr, sendo que as medidas foram feitas com condições *default* do equipamento (Tabela 4). Depois disso, para o estudo das temperaturas e modificador químico, foram construídas as curvas de pirólise e de atomização para todos os modificadores estudados (Item 4.4), em intervalos definidos de temperaturas, e variando as temperaturas em $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.2 Otimização multivariada

Além da otimização univariada, foi feita uma otimização multivariada para Se e Cr, utilizando o corante E-132 na concentração de $2,5 \text{ g L}^{-1}$. Foram estudados os efeitos de matriz, tratamento da amostra, modificador químico, digestão *in situ*, temperaturas de pirólise e de atomização. As Tabelas 8 e 9 mostram os planejamentos experimentais realizados, as variáveis estudadas e em que condições os níveis de cada variável foram estudados.

Tabela 8. Planejamentos experimentais feitos para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Se em corantes alimentícios.

Variáveis estudadas (nível – e nível +)	
(2^{6-1})	Matriz (Padrão aquoso e corante); Tratamento da amostra (US e mineralização); Modificador químico (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e Ir 500 µg- Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg); Digestão <i>in situ</i> (0 e 5 µL de ácido ascórbico 5% m/v); Pirólise/°C (1200 e 1300); Atomização/°C (1800 e 2000).
(2^{6-2})	Matriz (Padrão aquoso e corante); Pirólise/°C (1100 e 1200); Modificador (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e Ir 500 µg); Digestão <i>in situ</i> (5 µL e 10 µL de ácido ascórbico 5% m/v); Atomização/°C (1900 e 2100); Tempo de US/min (0 e 10).
(2^4)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (W 200 µg e 300 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).
(2^4)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e W 200 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).
(2^4)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (W 200 µg-Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e W 200 µg-Pd 5 µg/Ni 50 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).
(2^4)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e Pd 5 µg/Ni 50 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).
(2^4)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (Pd 5 µg/Ni 50 µg e Pd 5 µg/Ni 100 µg); Pirólise/°C (1000 e 1100); Atomização/°C (2000 e 2200).

Tabela 9. Planejamentos experimentais feitos para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Cr em corantes alimentícios.

Variáveis estudadas (nível – e nível +)	
(2⁶⁻¹)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Tratamento da amostra (US e mineralização); Modificador químico (0 e 15 µg Mg(NO ₃) ₂); Digestão <i>in situ</i> (0 e 5 µL de ácido ascórbico 5% m/v); Pirólise/°C (1500 e 1600); Atomização/°C (2300 e 2500).
(2³)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Pirólise/°C (1400 e 1500); Tempo de US/min (0 e 10).

4.6 Figuras de mérito

Usando a condição otimizada para as temperaturas do programa de aquecimento, foram construídas curvas analíticas de calibração para os analitos e os métodos foram avaliados por meio de testes de adição e recuperação, coeficiente angular da curva, RSD, LOD e LOQ. As adições foram feitas em triplicata, para cada corante. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir das equações: $(3 \times s/\alpha)$ para LOD e $(10 \times s/\alpha)$ para LOQ, onde s é o desvio padrão do branco (reagentes na ausência do analito) e α o coeficiente angular ou sensibilidade da curva de calibração [8, 24, 58].

4.7 Determinação de selênio, cromo e cobre

Uma curva analítica externa (2-80 µg L⁻¹ Se) foi obtida utilizando Pd 5 µg/Mg(NO₃)₂ 3 µg como modificador químico, sendo que testes de adição e recuperação em três níveis de concentração foram feitos para cada um dos corantes estudados, aos finais, 20, 50 e 80 µg L⁻¹ de Se foram adicionados a 2,5 g L⁻¹ de corante. Curvas baseadas na adição de analito (16-80 µg L⁻¹ Se) também foram construídas para cada corante. O método de ajuste de matriz (*matrix-matching*) foi avaliado usando

a curva obtida para o corante E-132, com a adição de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se para cada corante.

Para o Cr foram construídas duas curvas em meio aquoso, utilizando $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $15 \mu\text{g}$ como modificador, para monitorar menores ($2-17,5 \mu\text{g L}^{-1}$) e maiores ($10-80 \mu\text{g L}^{-1}$) concentrações de Cr nos corantes. Testes de adição e recuperação foram feitos nos níveis de 2; 7,5 e $15 \mu\text{g L}^{-1}$ para a curva de menor faixa em $2,5 \text{ g L}^{-1}$ do corante e nos níveis de 10 e $70 \mu\text{g L}^{-1}$ para a curva de maior faixa em $1,6 \text{ g L}^{-1}$ do corante. Também foram feitas curvas ($2-10 \mu\text{g L}^{-1}$) de adição de analito em cada corante, sendo que os testes de adição e recuperação em cada curva foram feitos com a adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr em cada corante, em suas respectivas curvas.

Já para o Cu as curvas em meio aquoso foram de $2-25 \mu\text{g L}^{-1}$ para monitorar menores concentrações do analito em $12,5 \text{ g L}^{-1}$ do corante e de $10-100 \mu\text{g L}^{-1}$ para maiores concentrações de Cu em 5 g L^{-1} dos corantes, na presença de Pd $5 \mu\text{g}$ / $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $3 \mu\text{g}$. Os testes de adição e recuperação na curva de menor faixa para o corante E-132 foram nos níveis de 2; 7 e $12 \mu\text{g L}^{-1}$, para o E-123 foram de 2; 10 e $17,5$ e para os demais corantes estudados foram de 10; $17,5$ e $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Na curva de maior faixa, para todos os corantes as adições foram de 10 e $90 \mu\text{g L}^{-1}$. Como para os outros analitos, curvas de adição de padrão ($2-25 \mu\text{g L}^{-1}$) também foram construídas, sendo que os testes de adição e recuperação em cada curva foram feitos com a adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, em cada corante, em suas respectivas curvas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados para a otimização univariada

5.1.1 Selênio

5.1.1.1 Resultados para o tratamento da amostra na determinação de selênio

Os testes iniciais mostraram que a sensibilidade do equipamento para Se era afetada pela concentração de HNO_3 , mesmo para o padrão aquoso. Isso pode ser explicado pelos diversos estados de oxidação do analito [59, 60]. Então, um teste da concentração de HNO_3 foi feito, tanto para a amostra quanto para o padrão aquoso, visando a obtenção do analito em um único estado de oxidação. A Figura 8 mostra o efeito da porcentagem do ácido sobre a absorbância integrada para Se no padrão e no corante e também a absorbância de fundo para o corante. Esses testes foram feitos usando o modificador universal Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg .

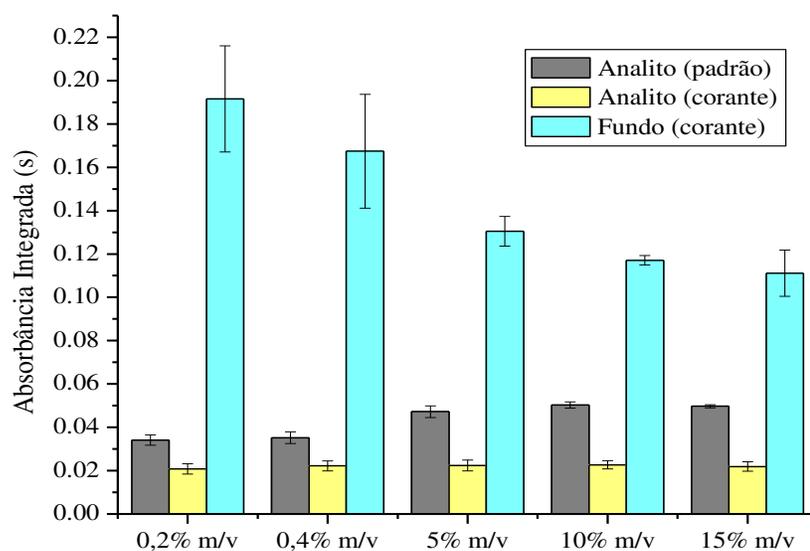


Figura 8. Absorbância referente a 0,6 ng de Se presente no padrão e no corante e fundo do corante em diferentes concentrações de HNO_3 .

Observando a Figura 8, pode-se dizer que a absorvância para o analito no corante é praticamente a mesma em qualquer concentração do ácido, mas o sinal para Se no padrão aquoso apresenta uma tendência de aumento com a concentração do ácido. Por outro lado, a absorvância para o fundo diminui, mostrando que quanto maior a porcentagem do ácido, mais as moléculas do corante podem estar sendo destruídas, facilitando assim a eliminação da amostra na etapa de pirólise.

Na Figura 9 é apresentado o estudo do tratamento da amostra. Observando as absorvâncias do analito em todos os tratamentos é possível concluir que não é necessária a mineralização da amostra e nem a utilização do banho de ultrassom, pois as absorvâncias para o analito em cada tratamento estão muito próximas. Quando a absorvância para o fundo é analisada, o melhor tratamento seria o da mineralização assistida por micro-ondas, mas como a absorvância para o analito é a de interesse, a DA foi utilizada para os demais estudos.

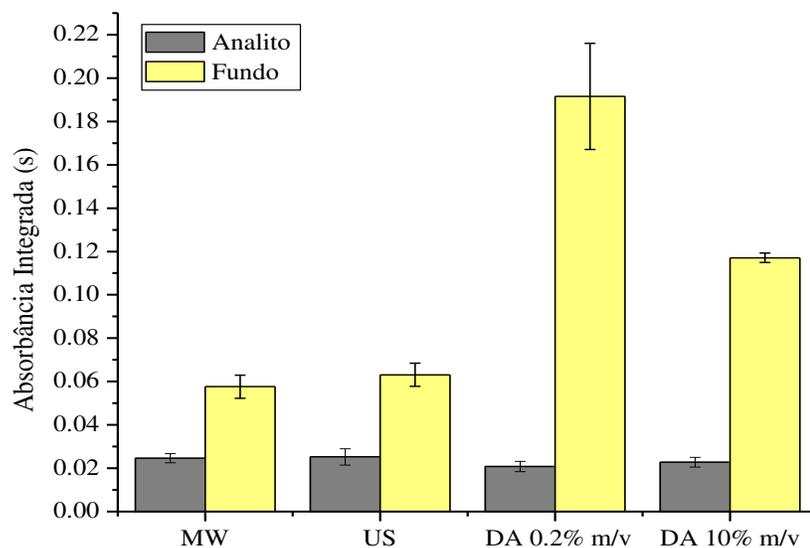


Figura 9. Sinal para a absorvância para 0,6 ng de Se presente no corante e absorvância para o fundo em cada tratamento utilizado.

5.1.1.2 *Estudo de modificadores químicos*

Depois de feita a escolha do método de preparo de amostra, foi feito o estudo dos modificadores químicos e das temperaturas de pirólise e de atomização.

5.1.1.2.1 *Modificação química convencional*

Diversos trabalhos mostram a dificuldade para obter um modificador capaz de estabilizar Se em altas temperaturas de pirólise, até a eliminação completa da matriz [19, 30, 31, 34, 61, 62]. Por isso, foram estudados um grande número de modificadores químicos, individualmente e também diferentes combinações entre os mesmos. A Figura 10 mostra diferentes combinações estudadas para o modificador químico convencional Pd/Mg, sugerido pelo fabricante. Observando as curvas de pirólise e de atomização obtidas para essas combinações é possível perceber que quanto maior a quantidade de Pd utilizada, maior o sinal analítico. Entretanto, o perfil do sinal analítico do analito e o seu tempo de aparecimento e retorno para a linha de base muda bruscamente, deixando o pico muito alargado e com ruídos, devido ao aprisionamento do Se na superfície da plataforma na presença de Pd, uma vez que a atomização do analito é dificultada nessas condições de grandes quantidades de Pd. Esse perfil melhora quando as temperaturas de atomização são elevadas. Porém, fazer uso de temperaturas elevadas, leva ao desgaste do tubo de grafite e/ou plataforma, maiores desvios e também a uma diminuição na intensidade do sinal analítico com o tempo.

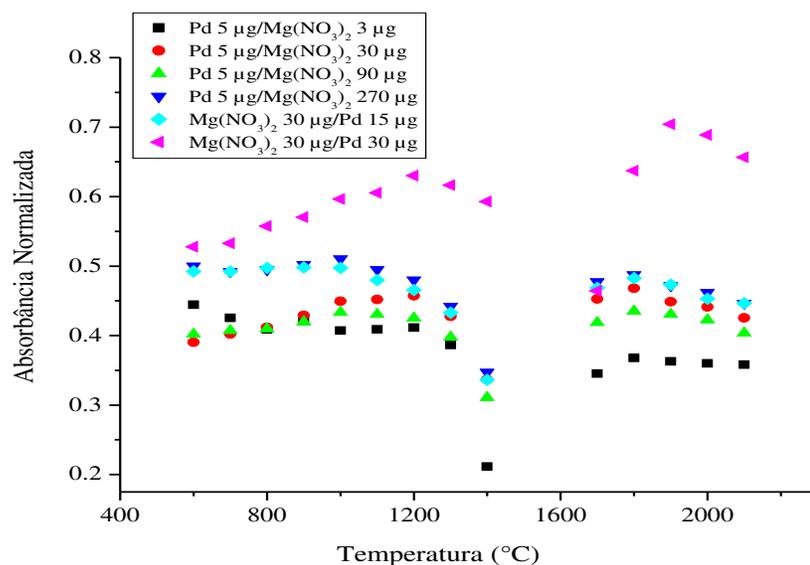


Figura 10. Curvas de pirólise e de atomização na presença de diferentes combinações de Pd/Mg para 2 ng de Se.

A fim de se obter o maior sinal analítico para Se na amostra, ou o sinal analítico mais próximo do sinal para o analito em um padrão aquoso de mesma concentração, foram estudados outros modificadores, além da combinação Pd/Mg, uma vez que é desejável a obtenção de um método no qual seja possível fazer a quantificação contra uma curva de calibração externa. Como as absorbâncias mostradas nas figuras estão normalizadas, pode-se dizer, observando as Figuras 11 e 12, que o uso da combinação Pd 5 µg/Ni 50 µg fornece uma recuperação de aproximadamente 80%. Apesar de não ser possível quantificar o Se utilizando uma curva de calibração externa, o uso de Ni como modificador diminui a volatilidade do analito no corante, quando comparado com o modificador universal. O perfil do sinal analítico foi adequado para este modificador, que foi o primeiro proposto para a estabilização de Se e ainda é bastante utilizado [31, 34, 60, 62, 63].

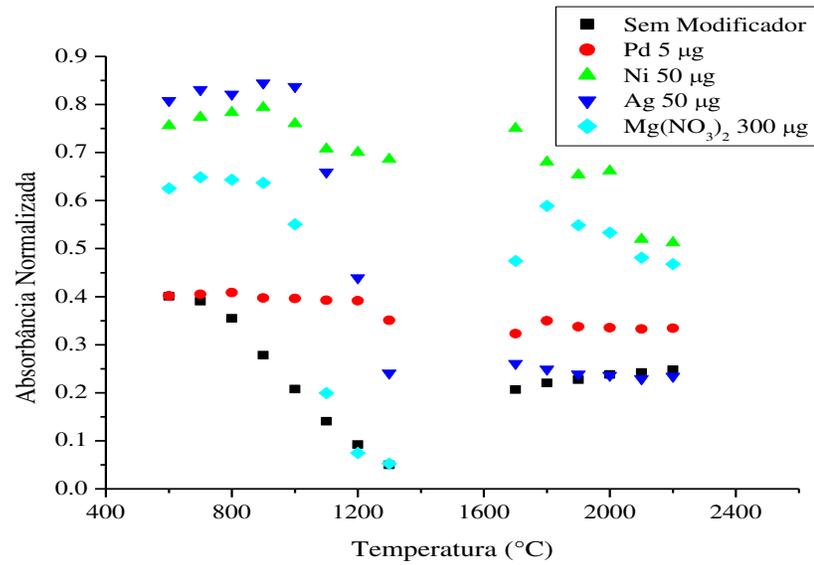


Figura 11. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se na presença de Pd, Ni, Ag e Mg como modificadores.

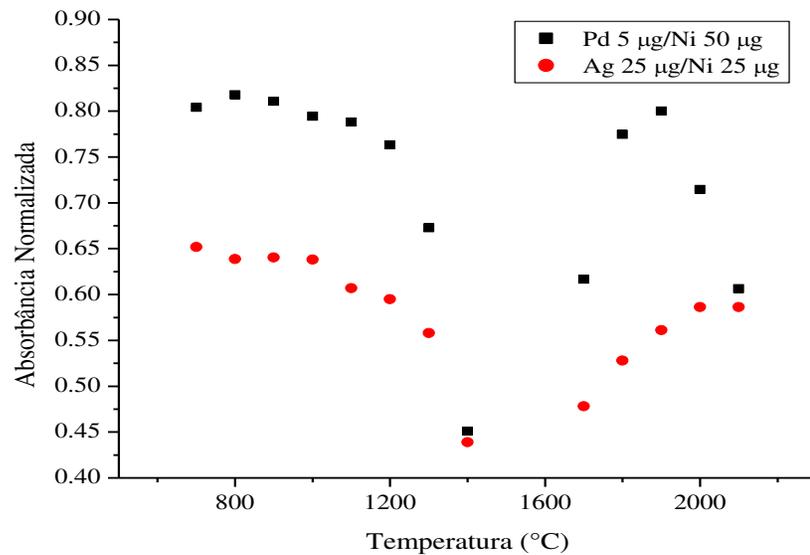


Figura 12. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se na presença de Pd/Ni e Ag/Ni como modificadores

Também foi feito o estudo de H_2O_2 como modificador químico, como mostra a Figura 13. Foram preparadas soluções do corante E-132 com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se e adicionaram-se quantidades de peróxido resultando em soluções de 20, 40 e 60% v/v. As medidas foram feitas em triplicata fazendo o uso conjunto de Pd $5 \mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $3 \mu\text{g}$ como modificador. Houve um acréscimo do sinal analítico, no entanto o perfil do pico é comprometido, para qualquer porcentagem do peróxido estudada, pois houve formação de picos duplos, o que significa que diferentes espécies de Se estão sendo formadas.

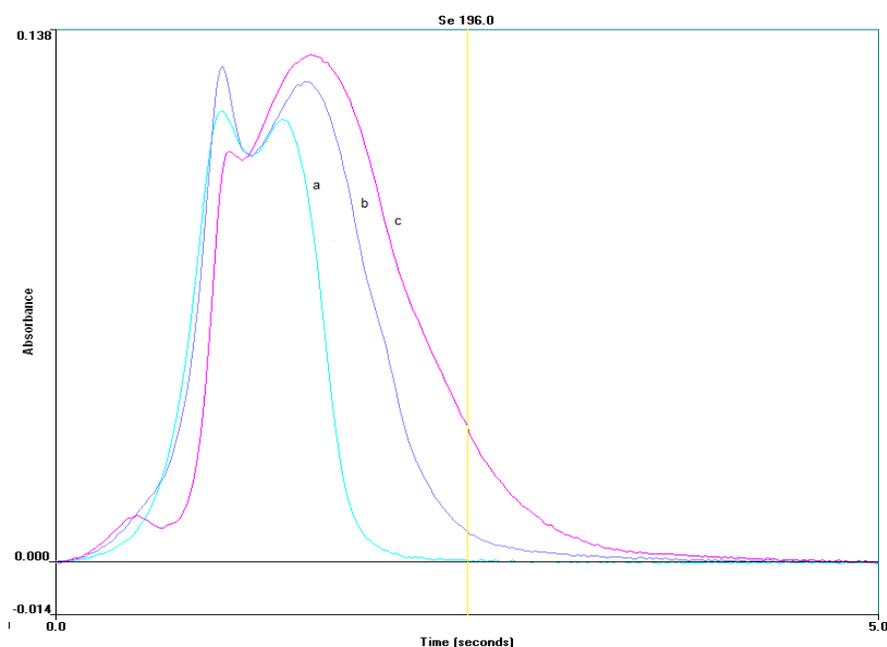


Figura 13. Sinal para absorbância de 2 ng de Se utilizando H_2O_2 como modificador (a - 20; b - 40; c - 60 % v/v de H_2O_2).

5.1.1.2.2 Modificação química permanente

A modificação química permanente vem sendo estudada para a determinação de diversos elementos em matrizes variadas. Neste trabalho, os modificadores permanentes estudados foram tungstênio e irídio, os quais são utilizados em diversos trabalhos descritos na literatura. Vieira *et al.* utilizaram Ir termicamente depositado como modificador químico para a determinação de As em sedimentos, carvão e cinzas [57]. Oliveira *et al.* estudaram W com a co-injeção de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como

modificadores para a determinação de Pb em vinagre [64]. Fariñas *et al.* estudaram W, Ir, Ru, W–Ir e W–Ru como modificadores para a determinação de Cr e Ni em bebidas [12]. Török *et al.* utilizaram W/Mg(NO₃)₂ como modificadores para a determinação de As and Sb em solos, lama e sedimento [65]. Dobrowolski *et al.* fizeram a determinação de Sb em sedimentos e solos usando Ir/Nb e Ir/W como modificadores químicos [66].

Para a determinação de Se em corantes foram feitas deposições de tungstênio na plataforma do tubo de grafite a partir de dois procedimentos de deposição, descritos no item 4.4. A Figura 14 mostra as curvas de pirólise e de atomização para o analito no corante E-132, com a deposição de 200, 300 e 250 µg de W, utilizando diferentes procedimentos experimentais, bem como a combinação W 200 µg- Pd 5 µg/Ni 50 µg e W 250 µg-Pd 5 µg/Mg(NO₃)₂ 90 µg. Também foi estudada a modificação permanente com 500 µg de Ir, depositado pelo procedimento descrito no item 4.4. e as combinações Ir-Pd 5 µg/Mg(NO₃)₂ 3 µg e Ir-Pd 5 µg/Ni 50 µg. Os resultados estão mostrados nas curvas de pirólise e de atomização mostradas na Figura 15.

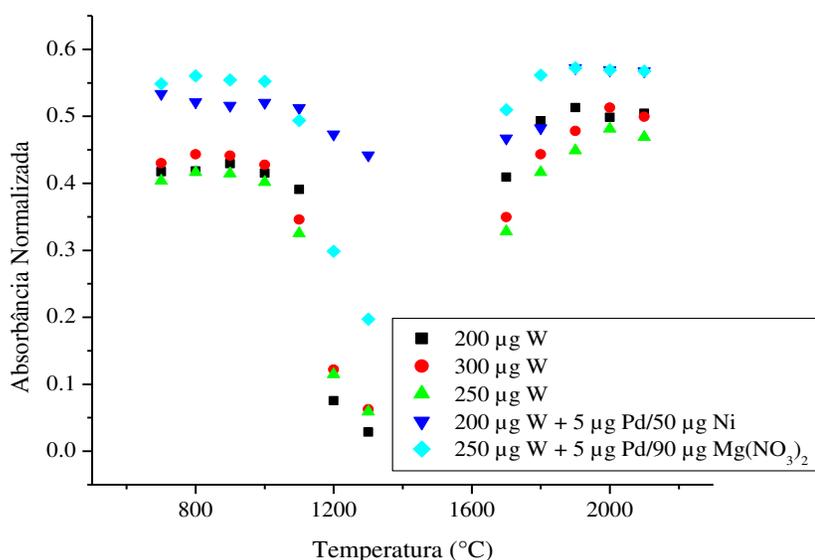


Figura 14. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se utilizando W como modificador permanente.

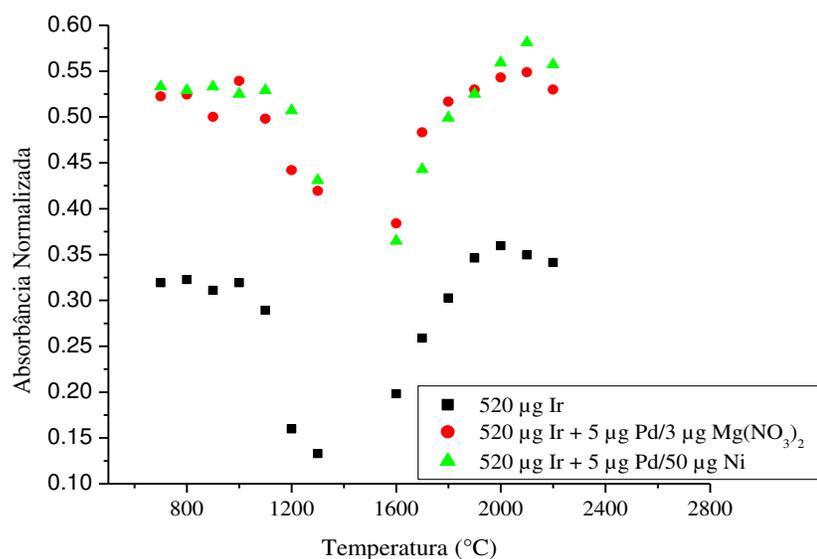


Figura 15. Curvas de pirólise e de atomização para 2 ng de Se utilizando Ir como modificador permanente.

Observando as curvas de pirólise e de atomização para os diferentes tratamentos da plataforma, é possível perceber que a modificação permanente, tanto com W quanto com Ir, sem a combinação com a modificação convencional, não estabilizaram o Se de forma adequada quando a temperatura de pirólise foi maior que 1000 °C. Isto pode ser explicado pelo aprisionamento do analito na plataforma modificada (Se-W e Se-Ir), dificultando a sua atomização. Por outro lado, com a co-injeção dos modificadores em solução, o Se foi estabilizado até 1200°C. No entanto, não houve melhora em relação às outras modificações estudadas e as recuperações não chegaram a 60% em relação ao padrão aquoso.

Na Figura 16 é mostrada a absorbância para o analito e na Figura 17 a absorbância para o sinal para o fundo, no corante e no padrão, nas temperaturas ótimas para cada modificador estudado. Observa-se que a absorbância para o Se, quando presente no corante, é maior na presença de Pd/Ni ou somente Ni e maior massa de Pd como modificadores, ao mesmo tempo que a absorbância para Se em padrão aquoso diminui. Isto pode ser devido ao efeito catalítico do modificador de Ni sobre o corante alimentício, ou seja, na presença de Ni a matriz está sendo eliminada

com maior eficiência. Por isso, quando são usados esses modificadores, as recuperações são mais altas em relação à absorvância com o restante dos modificadores estudados. Um efeito catalítico do modificador sobre a matriz de corante, também pode ser observado quando é feito o uso de Ir como modificador, pois a absorvância de fundo para o corante é menor que a absorvância de fundo utilizando outros modificadores, ao contrário do que ocorre quando é feito o uso de W como modificador. As absorvâncias para o fundo crescem muito na presença de Ni e, como consequência, pode haver maiores desvios nas medidas.

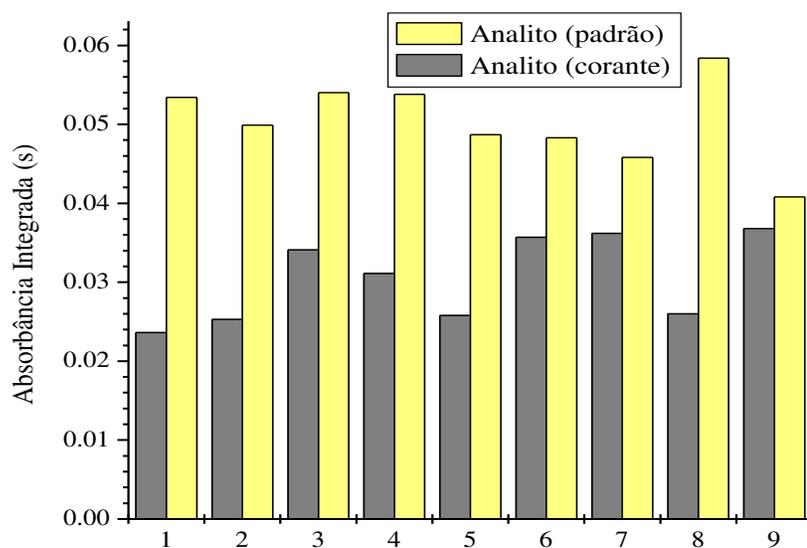


Figura 16. Absorvância para 0,6 ng de Se presente no padrão e no corante, utilizando as melhores condições para cada modificador (1-Ir-Pd/Mg; 2-Ir-Pd/Ni; 3-W-Pd/Mg; 4- W-Pd/Ni; 5-Pd; 6-Ni; 7-Pd/Ni; 8-Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg , 9-Mg(NO₃)₂ 30 μg /Pd 30 μg).

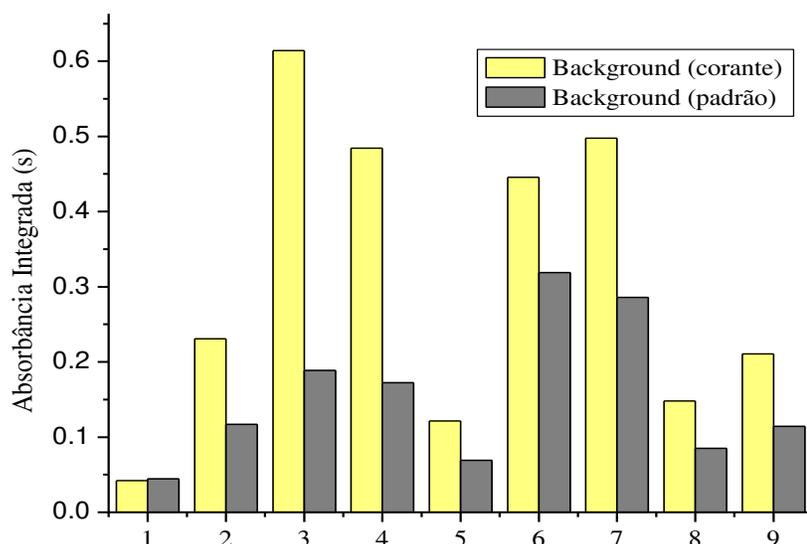


Figura 17. Absorbância para o fundo no padrão e no corante ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), utilizando as melhores condições para cada modificador (1-Ir-Pd/Mg; 2-Ir-Pd/Ni; 3-W-Pd/Mg; 4- W-Pd/Ni; 5-Pd; 6-Ni; 7-Pd/Ni; 8-Pd $5 \mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $3 \mu\text{g}$, 9-Mg(NO_3) $_2$ $30 \mu\text{g}$ /Pd $30 \mu\text{g}$).

Na figura 18 são mostrados os sinais para a absorção de Se na presença de alguns modificadores. É possível comprovar que o uso de W, Ir, Ag ou grande quantidade de Pd não favorece a atomização do analito. Observando a figura, é possível observar a defasagem temporal quando são utilizados os modificadores Ir, W e Ir-Pd/Mg, ou seja, quando a matriz é considerada e esses modificadores são utilizados, o aparecimento do pico de absorvância inicia em um tempo menor de atomização em relação ao padrão aquoso, o que pode estar ligado ao efeito catalítico do modificador sobre a matriz. Também é possível observar que o uso de Ni ou do modificador convencional favorecem o aparecimento de sinais adequados para a absorção do analito, ou seja, sinais mais estreitos e simétricos.

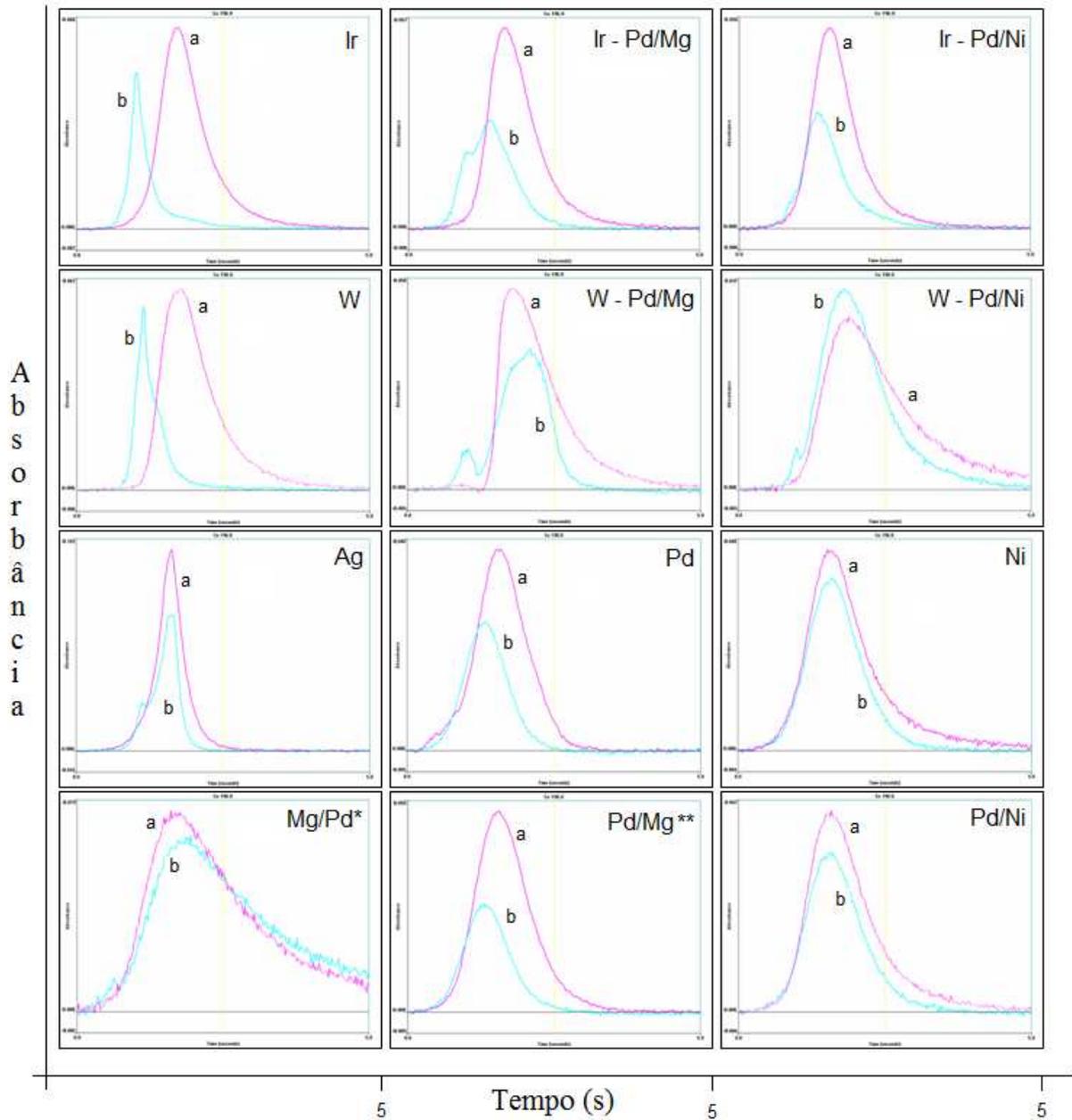


Figura 18. Perfil do sinal analítico para Se na presença de diferentes modificadores. a – 2 ng de Se no padrão aquoso e b – 2 ng de Se no corante (* $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 30 μg /Pd 30 μg).

5.1.1.3 *Estudo do tempo de pirólise*

Devido à grande dificuldade para a obtenção de um modificador que fosse capaz de recuperar 100% do selênio adicionado na amostra, o efeito do tempo de rampa e de sustentação para a pirólise foi avaliado. Os tempos de rampa estudados foram de 10, 15, 20, 25 e 30 segundos, enquanto que os de sustentação foram de 20, 25, 30, 35 e 40 segundos. Avaliando os sinais analíticos resultantes de diferentes combinações desses parâmetros não houve uma variação significativa na absorbância para o Se. Por outro lado, a absorção para o fundo diminuiu à medida que o tempo de cada etapa aumentou. Então, é conveniente utilizar o *default* do equipamento (rampa 10 s e sustentação 20 s), para não diminuir a vida útil do tubo de grafite.

5.1.1.4 *Determinação de Selênio*

Considerando os resultados obtidos no estudo de modificadores químicos, foi selecionado o modificador convencional Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg , além da temperatura de pirólise de 1300 °C e de atomização de 1800 °C para a construção de curvas analíticas por calibração externa e também pelo método de adição de analito, para cada corante estudado (Figura 19).

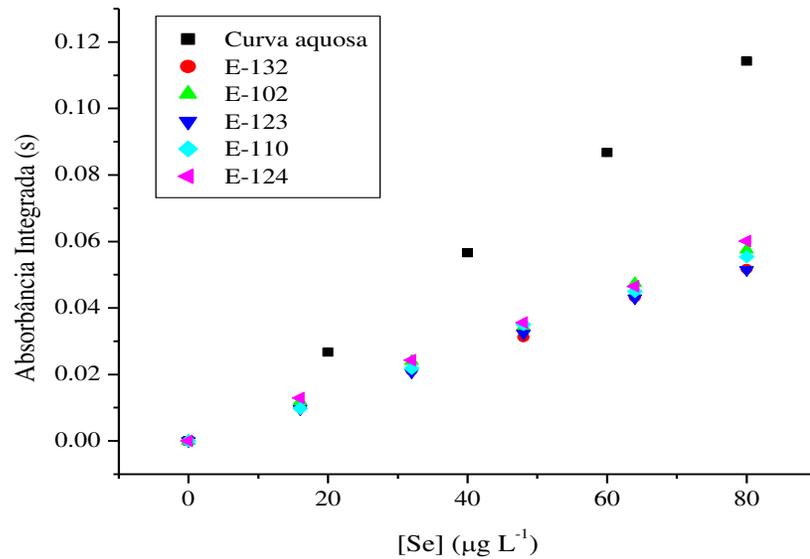


Figura 19. Curvas analíticas de calibração externa e pelo método de adição de analito.

Na Tabela 10 são mostradas as figuras de mérito para Se, tanto para a curva analítica em meio aquoso quanto para as curvas obtidas pelo método de adição de analito, para todos os corantes. Observando as curvas e suas inclinações, verificou-se que há um efeito significativo de matriz, também observado nos estudos dos modificadores. E também observado no estudo de adição e recuperação, e posterior leitura usando a curva de calibração externa (Tabela 11). Como as recuperações foram em torno de 50%, não é recomendado determinar de selênio nessas condições. Assim, a utilização do método de ajuste de matriz para a determinação de selênio em corantes alimentícios foi avaliada.

Tabela 10. Figuras de mérito para as curvas analíticas, (A) curva de calibração externa e as curvas pelo método de adição de analito para os corantes.

	r	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD (mg kg^{-1})	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ (mg kg^{-1})	α^* unidade
(A)	0,9998	20 – 80	0,65	0,26	2,18	0,87	0,0014
E-132	0,9994	16 – 80	1,55	0,62	5,17	2,07	0,0007
E-102	0,9995	16 – 80	2,46	0,98	8,19	3,28	0,0007
E-123	0,9991	16 – 80	1,68	0,67	5,59	2,24	0,0007
E-110	0,9957	16 – 80	2,50	1,00	8,32	3,33	0,0007
E-124	0,9994	16 – 80	1,72	0,69	5,76	2,30	0,0007

* α – coeficiente angular.

Tabela 11. Recuperação de selênio em nível baixo [$20 \mu\text{g L}^{-1}$], médio [$50 \mu\text{g L}^{-1}$] e alto [$80 \mu\text{g L}^{-1}$] nos corantes, utilizando a curva de calibração externa.

Corante	Rec. $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (% \pm s)	Rec. $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (% \pm s)	Rec. $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (% \pm s)
E-132	45	48	50
E-102	45	49	52
E-123	50	52	54
E-110	56	50	55
E-124	54	52	58

*s = desvio padrão p/ n = 3.

As inclinações das curvas obtidas pelo método de ajuste de matriz foram muito semelhantes, indicando que qualquer um dos corantes estudados pode ser utilizado para determinar Se em qualquer outro corante. Isso também foi comprovado pelo teste de adição e recuperação de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se nos corantes, sendo que a leitura foi realizada em triplicata na curva obtida pelo método de adição de analito com o corante E-132. A Tabela 12 mostra os valores de recuperação para os corantes na curva de adição do E-132.

Tabela 12. Recuperação de Se [$60 \mu\text{g L}^{-1}$] nos corantes, utilizando a curva de adição de analito do corante E-132.

Corante	Recuperação de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ (% \pm s)
E-132	90
E-102	89
E-123	90
E-110	98
E-124	92

*s = desvio padrão p/ n = 3.

Como não foi detectado Se nos corantes estudados pelo método desenvolvido, é provável que o mesmo se encontre abaixo do limite de detecção do método. Entretanto, se o Se estiver presente em quantidade acima do limite de detecção, a curva pelo método de ajuste de matriz deve ser utilizada para a determinação, pois há um significativo efeito de matriz e os modificadores estudados não foram eficientes para estabilizar o Se na matriz de corante alimentício. O método de ajuste de matriz apresentou exatidão, uma vez que as recuperações ficaram entre 90 e 100% e os desvios relativos foram menores que 10% para todos os corantes, mostrando a precisão do método. A principal vantagem do procedimento proposto é a possibilidade de determinação de Se, caso a concentração presente no corante seja superior ao limite de quantificação, sem a necessidade de qualquer preparo da amostra, fazendo apenas a dissolução em ácido nítrico 10% m/v, diminuindo, assim, a possibilidades de erros experimentais e de contaminação.

5.1.2 Cromo e Cobre

As temperaturas ótimas para as etapas de pirólise e de atomização a serem utilizadas na determinação de Cr e Cu nos corantes foram selecionadas a partir das curvas mostradas nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Observando as curvas obtidas para Cr foi possível selecionar a temperatura de 1500 °C para a etapa de pirólise e de 2500 °C para a de atomização, uma vez que a absorvância decresce abaixo dessa temperatura, para os corantes E-102, E-123 e E-110. Para o Cu a temperatura de pirólise escolhida foi a de 1200 °C e a de atomização foi de 2000 °C.

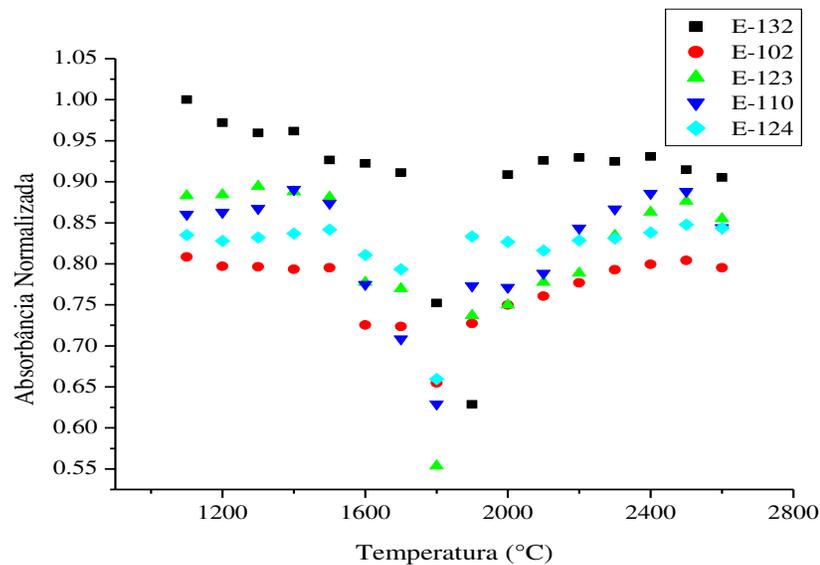


Figura 20. Curvas de pirólise e de atomização para 0,2 ng de Cr utilizando $Mg(NO_3)_2$ 15 μg como modificador.

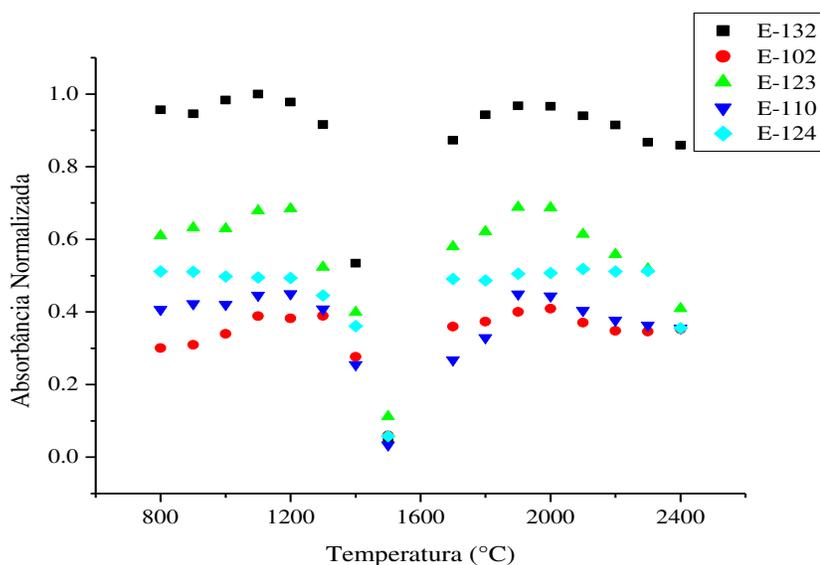


Figura 21. Curvas de pirólise e de atomização para 0,2 ng de Cu utilizando Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg como modificador.

As temperaturas para a pirólise e para a atomização para Cr não variam significativamente quando matrizes diferentes são estudadas, pois este analito, quando em contato com a plataforma de grafite pirolítico, forma um carbeto bastante estável. Sendo assim, a mesma estrutura deve ser rompida para a atomização do analito, mesmo em diferentes amostras e estas temperaturas geralmente são bastante elevadas. Daftsis *et al.* obtiveram temperaturas para a pirólise e atomização para Cr em sangue de 1500 °C e 2300 °C, respectivamente, quando utilizado o $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico [36]. Dobrowolski obteve temperaturas para a determinação de Cr em suspensão de solos de 1200 °C e 2500 °C, sendo que essa temperatura mais baixa para a pirólise é devida à introdução da amostra como suspensão [37]. Felipe-Sotelo *et al.* obtiveram temperaturas para a pirólise entre 1400-1600 °C e para a atomização entre 2300-2500 °C, dependendo do tipo do método de introdução da amostra utilizado (*current slurry analysis (USS)* e *"slurry extraction"(SE)*), sendo que os dois métodos apresentaram-se apropriados para a determinação do analito, o método (USS) para menores concentrações de cromo e (SE) para maiores concentrações [38]. Olmedo *et al.* selecionaram as temperaturas para a pirólise e a atomização de 1500 °C e 2400 °C,

respectivamente, para determinar Cr em sangue, urina, cabelo e saliva e obtiveram recuperações de 96,3 a 107,8% para o analito, nas diferentes amostras [10]. Fariñas *et al.* obtiveram as temperaturas de 1500 °C e de 2300 °C quando o modificador $Mg(NO_3)_2$ foi utilizado para determinar Cr em bebida alcoólica, mas quando os modificadores permanentes W, Ir, Ru, W-Ru ou W-Ir foram utilizados, as temperaturas de pirólise foram mais baixas, pois quando estes modificadores são usados, os sítios de carbono são substituídos por sítios metálicos, inibindo assim, a formação do carbeto estável do analito [12].

Para Cu as temperaturas para a pirólise e atomização variam muito dependendo da matriz, pois este analito é mais afetado por interferência de matriz, já que os compostos formados com o grafite não são tão estáveis quanto os compostos de Cr. Lobo *et al.* obtiveram as temperaturas para a pirólise e a atomização para Cu em biodiesel, utilizando Pd/Mg ou W como modificadores, de 1000 °C e 2200 °C, respectivamente [39]. Já Acar, utilizando a combinação Sc + Pd + NH_4NO_3 como modificador químico, conseguiu temperaturas de, 1350 °C e 2000 °C para a pirólise e a atomização, respectivamente, pois esta mistura permitiu uma alta estabilização do analito na plataforma [11]. Kiliç *et al.* obtiveram temperaturas de 1200 °C e de 2700 °C para a pirólise e a atomização, respectivamente, para a determinação de Cu em goma de mascar, utilizando a mistura W + Pd + ácido tartárico como modificador químico, comprovando que essa mistura possui um grande efeito estabilizador do analito [40].

5.1.2.1 Determinação de cromo e cobre

Foram construídas curvas analíticas, curva de calibração externa (uma compreendendo uma menor faixa e outra uma maior faixa de concentração) e pelo método de adição de analito (compreendendo a menor faixa) para cada corante estudado, a fim de investigar o efeito da matriz na determinação de Cr e Cu nos corantes. Nas Tabelas 13 e 14 são mostradas as figuras de mérito para Cr e Cu, respectivamente. Comparando os coeficientes angulares das curvas, externa (A) e com adição de analito para Cr, que variam menos que 10% em relação à curva de calibração externa e, observando as recuperações em diferentes níveis de concentração, pode-se

dizer que a curva de calibração externa pode ser utilizada para a determinação do analito em corantes alimentícios, ou seja, não há efeito significativo de matriz. Porém, o uso do modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 15 μg foi necessário, pois na ausência de qualquer modificador o Cr estava sendo perdido na etapa de pirólise, devido ao efeito da matriz dos corantes. As curvas para Cu não seguiram a mesma tendência das curvas para Cr. A curva do corante E-132 apresentou um coeficiente angular muito mais baixo em relação aos outros corantes e à curva de calibração externa (A). Já para o corante E-123 o coeficiente foi mais alto. Isso significa que a sensibilidade para o analito, quando presente no primeiro corante, é menor em relação à curva de calibração externa. Já para o segundo corante, ocorre o contrário.

Tabela 13. Figuras de mérito para as curvas analíticas de calibração externa para monitorar (A) menores e (B) maiores concentrações e as curvas pelo método de adição de analito para Cr.

	r	Curva ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD (mg kg^{-1})	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ (mg kg^{-1})	m_0 (pg)	α^*
(A)	0,9999	2-17,5	0,19	0,076	0,62	0,248	7,3	0,0128
(B)	0,9984	10-80	0,27	0,169	0,89	0,556	9,0	0,0089
E-132	0,9965	2-10	0,1	0,040	0,35	0,140	6,5	0,0126
E-102	0,9970	2-10	0,6	0,240	2,00	0,800	7,1	0,0134
E-123	0,9992	2-10	0,15	0,060	0,5	0,200	6,05	0,0142
E-110	0,9990	2-10	0,1	0,040	0,34	0,136	6,81	0,0125
E-124	0,9989	2-10	0,19	0,076	0,62	0,248	7,1	0,0132

α = coeficiente angular da curva, m_0 = massa característica.

Tabela 14. Figuras de mérito para as curvas analíticas de calibração externa para monitorar (A) menores e (B) maiores concentrações e as curvas pelo método de adição de analito para Cu.

	r	Curva ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD (mg kg^{-1})	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ (mg kg^{-1})	m_0 (pg)	α^*
(A)	0,9989	2-25	0,38	0,030	1,28	0,102	20,5	0,0044
(B)	0,9995	10-100	0,43	0,086	1,45	0,290	24,3	0,0039
E-132	0,9975	2-25	1,37	0,109	4,55	0,364	26,8	0,0032
E-102	0,9989	2-25	0,77	0,062	2,55	0,204	18,7	0,0046
E-123	0,9989	2-25	0,79	0,063	2,64	0,211	15,5	0,0056
E-110	0,9996	2-25	0,34	0,027	1,14	0,091	17,9	0,0048
E-124	0,9998	2-25	0,38	0,030	1,28	0,102	17,1	0,0044

α = coeficiente angular da curva, m_0 = massa característica.

As Tabelas 15 a 18 mostram os teores de Cr e Cu encontrados em cada corante, bem como os valores de RSD para três amostras de cada corante, utilizando as curvas analíticas de calibração externa, nas faixas menores e maiores estudadas. Os últimos pontos das curvas de maior faixa compreendem os limites da legislação brasileira para Cu que é de 20 mg kg^{-1} e o limite estabelecido pelo JECFA para Cr que é de 50 mg kg^{-1} [6, 7].

Tabela 15. Teor de Cr encontrado nos corantes [2,5 g L⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa (2-17,5 µg L⁻¹), RSD e valores de recuperação em nível baixo 2 µg L⁻¹, médio 7,5 µg L⁻¹ e alto 15 µg L⁻¹.

Corante	mg kg ⁻¹ ± s	RSD (%)	Rec. nível baixo (% ± s)	Rec. nível médio (% ± s)	Rec. nível alto (% ± s)
E-132	1,16 ± 0,09	7,9	95	92	107
E-102	< LOD	-	98	96	96
E-123	0,69 ± 0,01	1,3	100	100	100
E-110	0,10 ± 0,01	6,1	101	91	104
E-124	0,10 ± 0,01	9,9	104	102	109

*s = desvio padrão p/ n = 3.

Tabela 16. Teor de Cr encontrado nos corantes [1,6 g L⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa (10-80 µg L⁻¹), RSD e valores de recuperação em nível baixo 10 µg L⁻¹ e alto 70 µg L⁻¹.

Corante	mg kg ⁻¹ ± s	RSD (%)	Rec. 10 µg L ⁻¹ (% ± s)	Rec. 70 µg L ⁻¹ (% ± s)
E-132	1,17 ± 0,11	9,7	109	98
E-102	< LOD	-	103	92
E-123	< LOQ	-	100	94
E-110	< LOQ	-	96	94
E-124	< LOQ	-	93	92

*s = desvio padrão p/ n = 3.

Tabela 17. Teor de Cu encontrado nos corantes [12,5 g L⁻¹ do corante] usando a curva analítica de calibração externa, RSD e valores de recuperação em nível baixo (2 e 10 µg L⁻¹), médio (7; 10 e 17,5 µg L⁻¹) e alto (12; 17,5 e 25 µg L⁻¹).

Corante	mg kg ⁻¹ ± s	RSD (%)	Rec. nível baixo (% ± s)	Rec. nível médio (% ± s)	Rec. nível alto (% ± s)
E-132	1,0 ± 0,05	4,8	122	101	107
E-102	< LOD	-	88	94	96
E-123	0,35 ± 0,01	1,3	97	119	119
E-110	< LOD	-	95	106	97
E-124	< LOD	-	97	112	114

*s = desvio padrão p/ n = 3.

Tabela 18. Teor de Cu encontrado nos corantes [5 g L⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa (10-100 µg L⁻¹), RSD e valores de recuperação em nível baixo 10 µg L⁻¹ e alto 90 µg L⁻¹.

Corante	mg kg ⁻¹ ± s	RSD (%)	Rec. 10 µg L ⁻¹ (% ± s)	Rec. 90 µg L ⁻¹ (% ± s)
E-132	1,18 ± 0,03	2,8	91	90
E-102	< LOD	-	94	89
E-123	0,66 ± 0,02	3,5	130	97
E-110	< LOD	-	90	90
E-124	< LOD	-	99	105

*s = desvio padrão p/ n = 3

Na Tabela 19 são mostrados os valores das concentrações de Cr e Cu em cada corante, a partir do cálculo utilizando a curva de adição de analito, bem como seus respectivos RSDs. Também são mostradas as recuperações de 10 µg L⁻¹ de Cu e Cr para cada corante em sua respectiva curva. O Cu não pode ser quantificado nos

corantes E-132 e E-123 utilizando a curva de calibração externa, pois as recuperações ficaram fora da faixa 90-110%. Assim, é necessário mostrar essas recuperações na curva de adição de analito, confirmando que essa estratégia pode ser utilizada.

Tabela 19. Teor de Cr e Cu encontrado nos corantes através da curva de adição de analito, RSD e valores de recuperação para $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Corante	Cr			Cu		
	$\text{mg kg}^{-1} \pm s$	RSD (%)	Rec. $\pm s$	$\text{mg kg}^{-1} \pm s$	RSD (%)	Rec. $\pm s$
E-132	$1,14 \pm 0,05$	4,8	103	$1,7 \pm 0,04$	2,8	109
E-102	< LOD	-	95	< LOD	-	98
E-123	$0,65 \pm 0,03$	4,1	98	$0,32 \pm 0,01$	4,0	96
E-110	$0,12 \pm 0,01$	6,1	108	< LOD	-	93
E-124	$0,11 \pm 0,01$	6,9	101	< LOD	-	100

*s = desvio padrão p/ n = 3.

Em se tratando de precisão, exatidão e repetibilidade para a determinação de Cr em corantes, o método de quantificação contra uma curva de calibração externa apresentou um bom desempenho. Os testes de recuperação em três níveis diferentes de concentração forneceram valores entre 90 e 110% e os desvios padrão relativos, para três amostras, ficaram abaixo de 10%. Já para Cu, o mesmo pode ser dito para os corantes E-102, E-102 e E-124, no entanto, para os outros corantes é necessário utilizar o método de adição de analito para a sua quantificação.

5.1.2.2 Aplicação

Os métodos desenvolvidos para Cr e Cu foram utilizados para a determinação dos analitos em alguns corantes alimentícios obtidos comercialmente. As determinações foram feitas utilizando a DA como preparo de amostra e as curvas de calibração para monitorar baixas concentrações de Cr e Cu em corantes, sendo que os modificadores utilizados foram $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $15 \mu\text{g}$ para Cr e $\text{Pd } 5 \mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $3 \mu\text{g}$ para Cu. Nas Tabelas 20 e 21 são mostrados os teores dos analitos presentes em cada corante.

Tabela 20. Teor de Cr encontrado nos corantes [12,5 g L⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa para monitorar baixas concentrações de Cr e RSDs das medidas.

Corante	Cr	
	mg kg ⁻¹ ± s	RSD (%)
E-132	0,59 ± 0,05	8
E-102	0,40 ± 0,03	7
E-123	< LOQ	-
E-127	0,30 ± 0,01	4

*s = desvio padrão p/ n = 2.

Tabela 21. Teor de Cu encontrado nos corantes [12,5 g L⁻¹ do corante] através da curva analítica de calibração externa para monitorar baixas concentrações de Cu e RSDs das medidas.

Corante	Cu	
	mg kg ⁻¹ ± s	RSD (%)
E-132	0,127 ± 0,017	13
E-102	< LOD	-
E-123	< LOD	-
E-127	0,75 ± 0,07	9
E-129	1,68 ± 0,05	3

*s = desvio padrão p/ n = 2.

Observando os resultados é possível dizer que o consumo dos alimentos que contêm esses corantes não oferece risco a saúde, em relação à quantidade de Cr e Cu nos corantes, no caso da indústria alimentícia obedecer a quantidade de corante contida no alimento e estes alimentos estarem de acordo com a legislação e, ainda, se a dieta não ultrapassar o valor da ingestão diária de corante.

5.2 Resultados da otimização multivariada

Os métodos foram construídos a partir de otimizações univariadas, mas como já mencionado, foi observada uma grande dificuldade na obtenção de um método eficaz na determinação de Se nos corantes. Por isso, também foi utilizada a otimização multivariada a fim de comparar os dois tipos de otimização para Se e Cr e o resultado desejado foi a maior absorbância para os analitos.

A Tabela 22 mostra os planejamentos experimentais feitos para Se e os efeitos significativos a um nível de 95% de confiança. Quando é considerado o resultado médio entre as medidas, que foram realizadas em duplicata, observa-se que muitas variáveis e combinação entre elas possuem efeitos significativos a 95% de confiança. Por exemplo, a matriz, que foi considerada como uma variável, possui um efeito significativo em todos os planejamentos, sendo que o nível negativo sempre oferece resultados significativamente maiores que o nível positivo, ou seja, os valores de absorbância quando o padrão aquoso é considerado é sempre maior que o valor de absorbância quando é considerada a matriz de corante alimentício. Portanto, é confirmada a interferência de matriz na determinação de Se, como foi observado também no estudo univariado, usando qualquer dos modificadores estudados. Na otimização multivariada esse fato foi observado pelos gráficos de Pareto apresentados nas Figuras 22 e 23, os quais mostram que a matriz (variável 1) possui um efeito negativo e significativo para todos os planejamentos realizados

Tabela 22. Planejamentos experimentais, efeitos e interações significativas para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Se em corantes alimentícios.

Variáveis estudadas (nível – e nível +)	Variáveis e interações com efeitos significativos
(2 ⁶⁻¹) Matriz (Padrão aquoso e corante); Tratamento da amostra (US e mineralização); Modificador químico (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e Ir 500 µg-Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg); Digestão <i>in situ</i> (0 e 5 µL ácido ascórbico 5% m/v); Pirólise/°C (1200 e	Matriz (-); Pirólise (-); Matriz/Modificador (+); Matriz/Digestão <i>in situ</i> (+); Matriz/Atomização (+).

	1300); Atomização/°C (1800 e 2000).	
(2 ⁶⁻²)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Pirólise/°C (1100 e 1200); Modificador (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e Ir 500 µg); Digestão <i>in situ</i> (5 µL e 10 µL de ácido ascórbico 5%); Atomização/°C (1900 e 2100); Tempo de US/min (0 e 10).	Matriz (-); Modificador (-).
(2 ⁴)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (W 200 µg e 300 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).	Matriz (-); Pirólise (-); Matriz/Pirólise (-).
(2 ⁴)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e W 200 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).	Matriz (-); Modificador (-); Matriz/Modificador (-).
(2 ⁴)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (W 200 µg-Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e W 200 µg-Pd 5 µg/Ni 50 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).	Matriz (-); Modificador (+); Matriz/Modificador (+); Matriz/Atomização (+).
(2 ⁴)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (Pd 5 µg/Mg(NO ₃) ₂ 3 µg e Pd 5 µg/Ni 50 µg); Pirólise/°C (1100 e 1200); Atomização/°C (1900 e 2100).	Matriz (-); Pirólise (-); Atomização (-); Matriz/Modificador (+); Matriz/Pirólise (-); Matriz/Atomização (+); Modificador/Atomização (-);
(2 ⁴)	Matriz (Padrão aquoso e corante); Modificador (Pd 5 µg/Ni 50 µg e Pd 5 µg/Ni 100 µg); Pirólise/°C (1000 e 1100); Atomização/°C (2000 e 2200).	Matriz (-); Atomização (-); Matriz/Modificador (+); Matriz/Atomização (+).

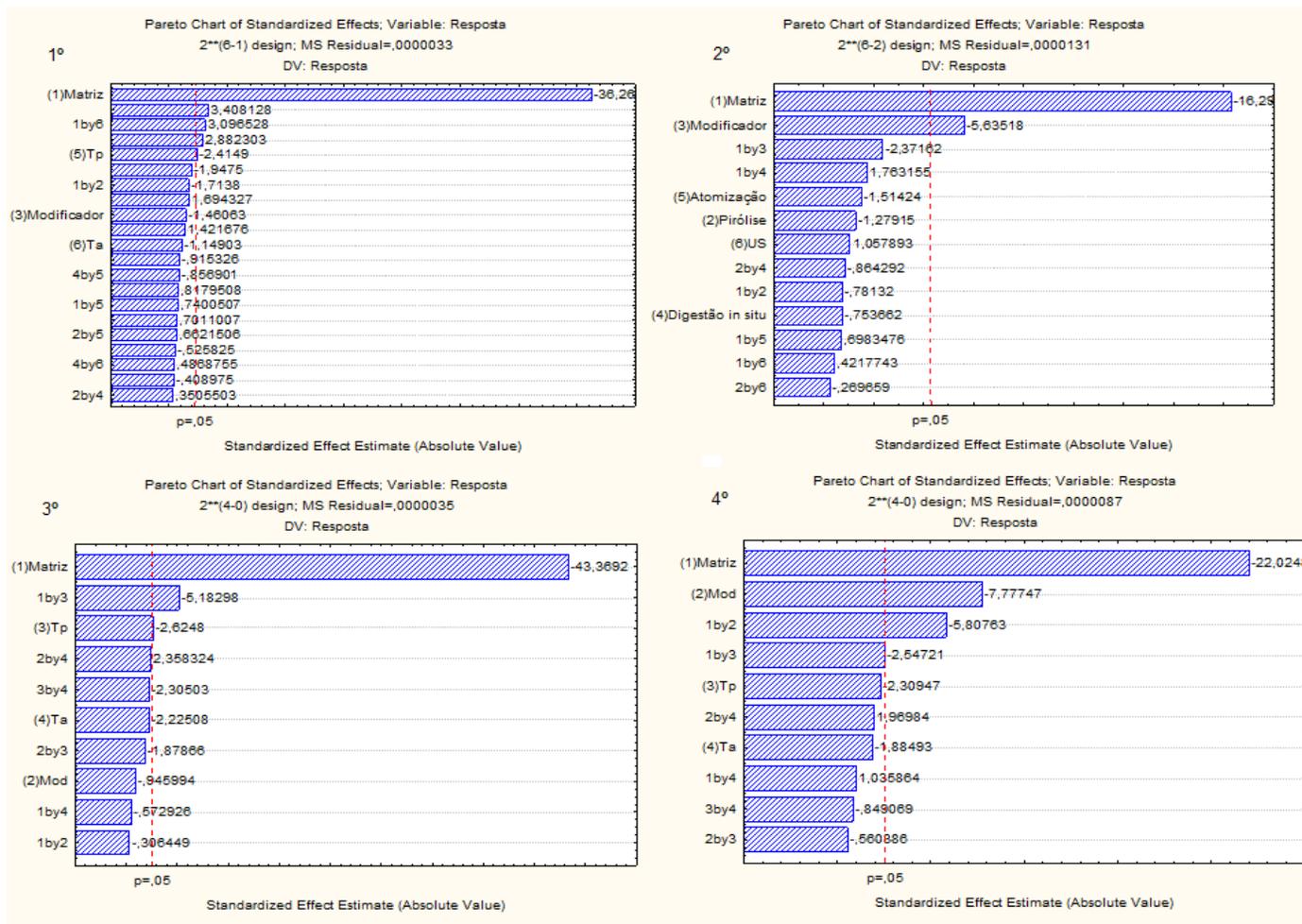


Figura 22. Gráficos de Pareto para os resultados do 1º ao 4º planejamento experimental feito para a otimização multivariada na determinação de Se em corantes alimentícios.

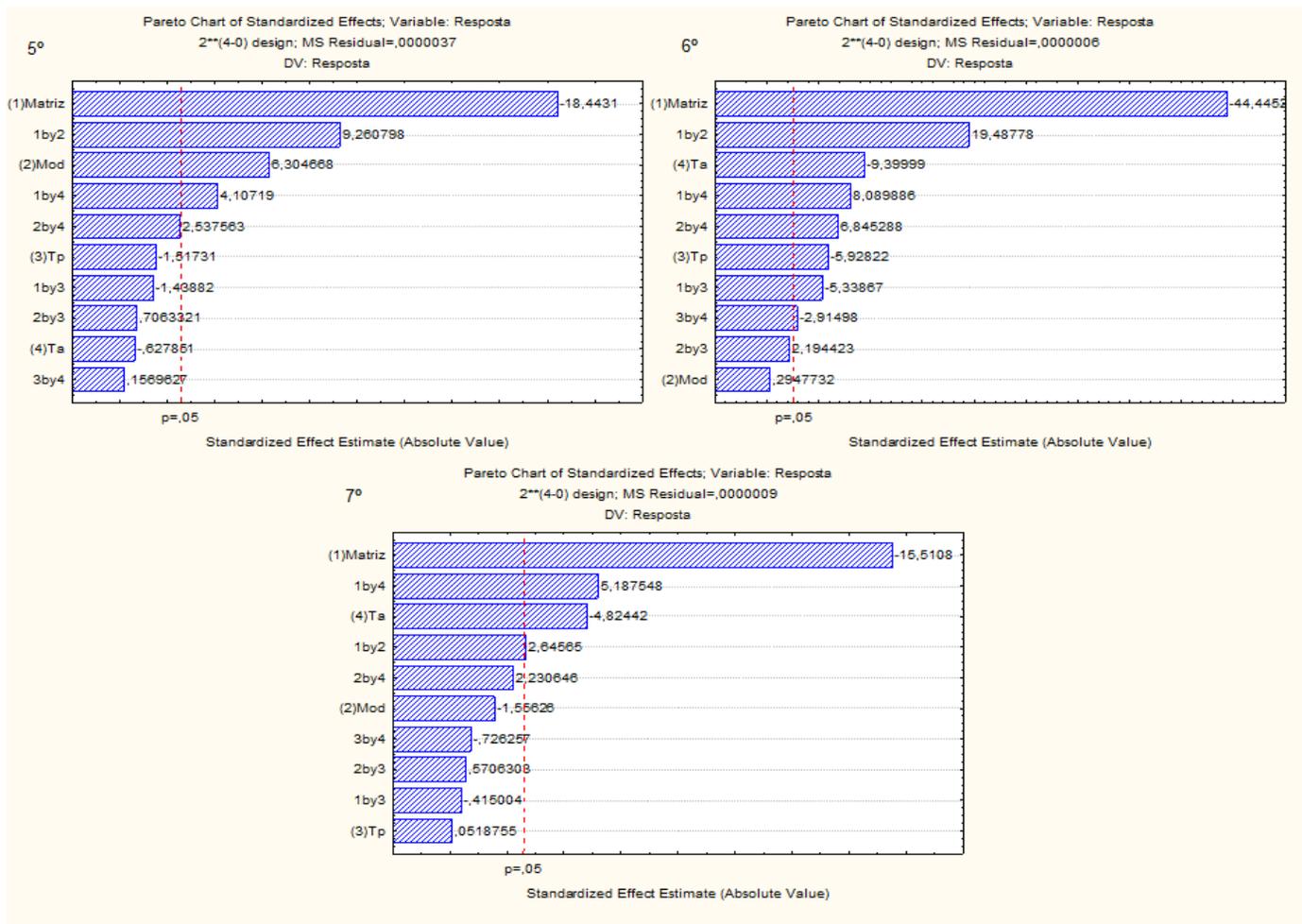


Figura 23. Gráficos de Pareto para os resultados do 5º ao 7º planejamento experimental feito para a otimização multivariada na determinação de Se em corantes alimentícios.

Ainda observando a Tabela 22 e as Figuras 22 e 23 é possível identificar, além da matriz, outras variáveis e interações significativas:

▪ No primeiro planejamento, sendo um planejamento fracionário 2^{6-1} , uma das variáveis significativas foi a temperatura de pirólise. Quanto menor a temperatura, maior a absorvância para Se no intervalo de temperatura estudado, quando usados os modificadores Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg ou a combinação Ir 500 μg - Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg . Também pode ser observado o efeito significativo das interações matriz/modificador, matriz/digestão *in situ* e matriz/atomização, indicando que quando a combinação Ir 500 μg -Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg e a digestão *in situ* são usadas, bem como quando a temperatura de atomização é aumentada, há um aumento na absorvância para o analito, quando presente no corante. O tratamento da amostra não forneceu resultados significativos.

▪ Para o segundo planejamento, um fracionário 2^{6-2} , além da matriz, a única variável com efeito significativo foi o modificador químico, que forneceu um efeito negativo, ou seja, o uso do modificador Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg (nível negativo) resulta em maiores valores de absorvância para o analito do que o modificador Ir 500 μg (nível positivo), resultado já obtido no estudo univariado. O tratamento da matriz não forneceu resultados significativos, por isso para os outros planejamentos o tratamento utilizado foi a DA.

▪ Para o primeiro planejamento completo e o terceiro realizado (2^4), além da matriz, a temperatura de pirólise e a interação matriz/pirólise tiveram um efeito negativo significativo. Portanto, nesse planejamento os resultados mostraram que se há variação da massa de W depositada, a absorvância não se altera em uma dada temperatura de pirólise e de atomização, porém, em temperaturas mais baixas de pirólise há um aumento na absorvância para o analito, tanto quando presente no padrão, quanto quando presente no corante.

▪ Para o quarto planejamento, sendo este um planejamento completo 2^4 , as temperaturas de pirólise e atomização nos intervalos estudados não apresentaram efeitos significativos, mas como nos outros planejamentos a matriz apresentou um efeito bastante significativo. Os modificadores estudados foram Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg (nível negativo) e W 200 μg (nível positivo), sendo que esta variável apresentou um efeito negativo significativo. Isto quer dizer que quando é feito o uso do modificador Pd

5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg a absorvância para o analito é maior do que quando é usado o W termicamente depositado, tanto para o analito presente no corante, quanto para o analito presente no padrão.

▪ Para o quinto planejamento, também um planejamento completo 2^4 , as variáveis matriz e modificador e as interações matriz/modificador, matriz/atomização apresentaram efeitos significativos a 95% de confiança. A variável modificador apresentou um efeito positivo significativo, ou seja, a combinação W 200 μg -Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Ni}$ 50 μg fornece maiores valores de absorção do que a combinação W 200 μg -Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg . Para a matriz de corante, a absorvância também cresce quando a temperatura de atomização é aumentada nessas condições de temperatura de pirólise e modificadores estudados no presente planejamento.

▪ Para o sexto planejamento, um planejamento completo 2^4 , as variáveis significativas foram a matriz, temperatura de pirólise e temperatura de atomização e as interações significativas foram matriz/modificador, matriz/pirólise, matriz/atomização e modificador/atomização. Com este planejamento é possível perceber que não há diferença significativa entre os modificadores Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 3 μg (nível negativo) e Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Ni}$ 50 μg (nível positivo) quando a absorvância do analito no padrão é considerada. Porém, quando o analito está presente no corante o modificador Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Ni}$ 50 μg fornece maiores absorvâncias, pois a interação matriz/modificador foi positiva. Este resultado já tinha sido observado no estudo univariado. Apesar do efeito da temperatura de atomização ser negativo, ou seja, quanto menor a temperatura de atomização maior a absorvância para o analito, a interação matriz/atomização foi positiva, pois para a matriz de corante o aumento da temperatura de atomização favorece o aumento da absorvância para o analito. Porém, quando é feito o uso do modificador Pd 5 $\mu\text{g}/\text{Ni}$ 50 μg o aumento da temperatura de atomização diminui a absorvância para o Se.

▪ Para o sétimo e último planejamento realizado para Se, um planejamento completo (2^4), os efeitos significativos foram a matriz e atomização e as interações foram matriz/modificador e matriz/atomização. Para as condições estudadas de temperatura de pirólise e modificadores, a temperatura de atomização teve um efeito negativo, ou seja, quanto menor a temperatura de atomização, maior a absorvância para o analito, mas esta conclusão deve ser feita considerando o padrão, pois a

interação matriz/atomização foi positiva, indicando que para os corantes alimentícios é favorável o aumento da temperatura de atomização. Sendo a interação matriz/modificador positiva e a variável modificador não tendo exercido efeito significativo, pode-se dizer que para o padrão, o aumento de massa de Ni não afeta os valores de absorvância, mas para a matriz de corante esse aumento eleva os valores de absorvância para Se.

Apesar do grande esforço para encontrar uma condição de compromisso, na qual a absorvância para o analito no corante fosse próxima a absorvância do Se no padrão, ou seja, que a absorvância variasse menos de 10% uma em relação a outra, não foi possível encontrar esta condição com os 7 planejamentos experimentais realizados, o que já tinha sido observado no estudo univariado.

Assim, a análise dos resultados obtidos nos planejamentos leva às mesmas conclusões do estudo univariado. Por exemplo, Ir e W não são bons modificadores para Se em corantes e a combinação Pd/Ni é o melhor modificador por fornecer maiores absorvâncias para Se em corante, porém, em temperaturas mais baixas de pirólise do que as necessárias com o modificador convencional Pd/Mg(NO₃)₂.

Esses resultados foram obtidos a partir das médias dos valores obtidos em duplicata de cada experimento, como mencionado no começo desta discussão. Caso os dois valores da duplicata fossem considerados, ou seja, quando os dois valores eram inseridos no programa Statistica, os planejamentos não geravam variáveis significativas com 95% de confiança. Isto pode ser explicado pelo fato de os valores de absorvância para Se, em qualquer dessas condições, apresentarem-se muito pequenos, no máximo 0,05 de absorvância e, também, ficarem muito próximos um do outro, mesmo variando as condições. Por exemplo, os valores de duas determinadas condições se repetem, mas sempre um dos valores de uma condição está entre os valores da outra condição, logo, o programa considera que são valores de uma mesma população e, então, não mostra efeitos significativos para nenhuma das variáveis estudadas.

Sendo assim, não foi observada nenhuma vantagem em trabalhar com planejamento experimental para a determinação de Se em corantes alimentícios, mesmo sabendo que esse tipo de otimização é mais rápida, torna possível o

conhecimento das interações entre as variáveis e é bastante eficaz para outros tipos de estudos.

Da mesma maneira procedida para Se, primeiramente, foi construído um planejamento experimental fracionário (2^{6-1}) para Cr. A Tabela 23 mostra este planejamento e as variáveis e interações com efeitos significativos. As variáveis estudadas foram o efeito de matriz, tratamento da amostra, modificador químico, digestão *in situ* e temperaturas de pirólise e de atomização. Observando os resultados (Figura 24), foi possível perceber que o uso do modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 15 μg (nível positivo) é essencial na determinação de Cr em corantes, pois a variável modificador apresentou um efeito positivo. A matriz, nas condições estudadas, ainda está interferindo negativamente, ou seja, a absorvância para o analito no corante é menor do que no padrão. A temperatura de pirólise teve um efeito negativo, sendo que a absorvância para o analito, tanto no corante quanto no padrão, é aumentada quando as temperaturas de pirólise são menores que 1600 °C, no intervalo de temperatura estudado. A interação modificador/pirólise apresentou um efeito positivo, ou seja, quando é feito o uso do modificador químico, torna-se possível trabalhar em faixas maiores de temperatura de pirólise, o que já era esperado quando foi feita a escolha do modificador. A temperatura de atomização não teve efeito significativo, logo, a opção foi trabalhar com a temperatura de 2500 °C, pois nessa temperatura foi obtido um perfil para o sinal analítico, ou seja, mais estreito do que em temperaturas mais baixas. Como o tratamento da amostra e a digestão *in situ* não apresentaram efeitos significativos, a mineralização assistida por radiação de micro-ondas e essa etapa de digestão foram descartadas. Todas essas conclusões foram resultado da análise do gráfico de Pareto para os dados deste planejamento (Figura 24).

Tabela 23. Planejamentos experimentais, efeitos e interações significativas para a otimização multivariada das condições de trabalho para a determinação de Cr em corantes alimentícios.

	Variáveis estudadas (nível – e nível +)	Variáveis e interações com efeitos significativos
(2^{6-1})	Matriz (Padrão aquoso e corante); Tratamento da amostra (US e mineralização); Modificador químico (0 e $Mg(NO_3)_2$ 15 μg); Digestão <i>in situ</i> (0 e ácido ascórbico 5% m/v); Pirólise/ $^{\circ}C$ (1500 e 1600); Atomização/ $^{\circ}C$ (2300 e 2500).	Matriz (-); Pirólise (-); Modificador (+); Modificador/Pirólise (+);
(2^3) Refinamento	Matriz (Padrão aquoso e corante); Pirólise/ $^{\circ}C$ (1400 e 1500); Tempo de US/min (0 e 10).	Sem efeitos significativos

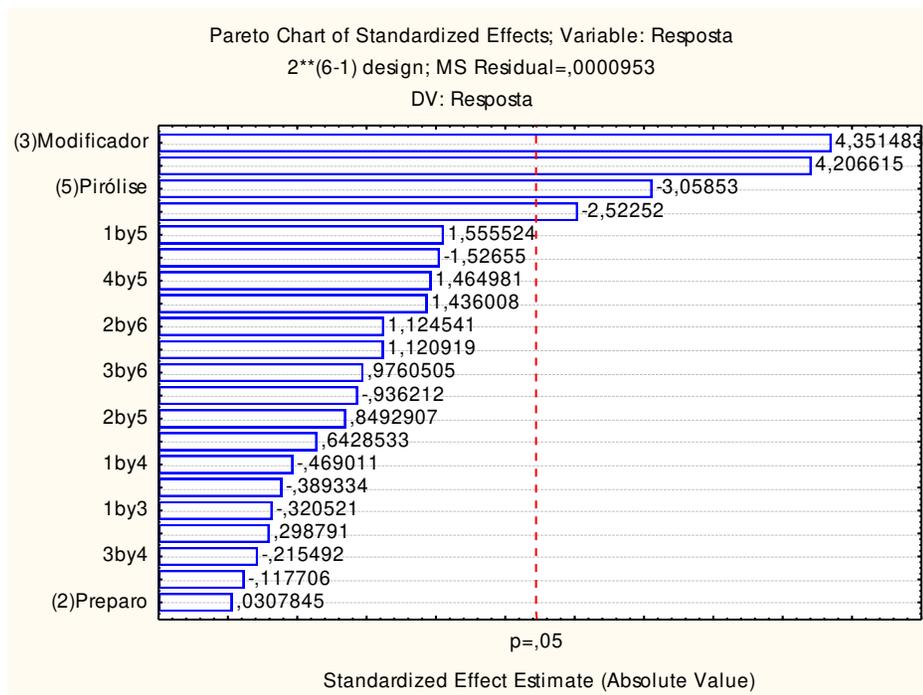


Figura 24. Gráfico de Pareto para os resultados do 1º planejamento experimental feito para a otimização multivariada na determinação de Cr em corantes alimentícios.

Para refinar esses dados, foi feito um novo planejamento completo 2^3 (Tabela 23). Desta vez, as variáveis estudadas foram o efeito de matriz, a pirólise e o tempo no banho de ultrassom. Desta vez, os dados desse planejamento não apresentaram nenhuma variável ou interação significativa, pois os valores das variáveis estão na região da condição ótima de trabalho. Como não há efeito de matriz nessas condições, a temperatura de pirólise escolhida foi a de 1500 °C e, como o tempo de ultrassom no nível negativo foi de 0 minutos, não é necessário o uso deste tratamento para a determinação de Cr em corantes. Sendo assim, com a otimização multivariada, chegou-se às mesmas conclusões do estudo univariado, isto é, que a DA pode ser utilizada na determinação de Cr em corantes e as temperaturas ótimas para o método foram de 1500 °C para a pirólise e de 2500 °C para a atomização.

Para Cr, observou-se uma vantagem trabalhar com o planejamento experimental, pois com apenas 40 experimentos foi possível estudar 6 variáveis e a interação entre todas. Entretanto, mostrou os mesmos resultados que a otimização univariada, logo, é possível afirmar que, para quem não possui um programa para tratar os dados dos planejamentos, é possível continuar trabalhando com a otimização univariada, uma vez que fornece resultados confiáveis tanto quanto a otimização multivariada para esse tipo de estudo.

Para Cu não foi feito o estudo multivariado, pois o estudo univariado já tinha sido feito e os valores obtidos para os planejamentos experimentais para Se e Cr não apresentaram-se satisfatórios, logo, optou-se por não realizar o estudo para este analito.

6 CONCLUSÕES

O método de “dissolução ácida” mostrou ser um procedimento de preparo de amostra tão adequado quanto a mineralização em forno de micro-ondas e o uso de ultrassom, pois forneceu valores semelhantes a estes, além de ser um procedimento simples, que não envolve muitas etapas de manipulação da amostra.

A determinação de Se em corantes alimentícios é dificultada, devido à complexidade das amostras, uma vez que na etapa de pirólise, na presença de qualquer dos modificadores estudados, acaba sendo eliminado junto com a matriz, mostrando que nenhum desses modificadores foi eficaz na estabilização de Se. Apesar de não ser possível utilizar uma curva de calibração externa, o método de ajuste de matriz pode ser utilizado para a determinação de Se nos corantes, pois as recuperações do analito nos corantes utilizando a curva do E-132 se apresentaram na faixa de 90-100%, confirmando a exatidão no método. Além disso, os RSDs ficaram abaixo de 10 %, mostrando que o método é preciso.

Os métodos para a determinação de Cr e de Cu não apresentaram as dificuldades encontradas para o Se. Porém, para os corantes E-132 e E-123 é necessário o uso da estratégia da curva de adição de analito para a quantificação de Cu. Os métodos apresentaram precisão, repetibilidade e exatidão adequadas.

Levando em consideração que a quantidade de corante adicionada ao alimento está na faixa de 5-600 mg kg⁻¹ (FAO/WHO), o consumo do corante não gera graves problemas, quando é considerada apenas a sua constituição inorgânica. As quantidades dos analitos de interesse encontradas nos corantes estudados são baixas. Fazendo a relação da quantidade ingerida por dia, observa-se que ficam abaixo da ingestão diária permitida. Segundo a FAO/WHO pode haver até 50 mg kg⁻¹ de Cr nos corantes e 40 mg kg⁻¹ de metais “pesados” em geral. Já para o Cu, a legislação brasileira diz que o limite é de 20 mg kg⁻¹, logo, os corantes estudados obedecem as normas estabelecidas [5, 6, 14].

Em relação a otimização multivariada, para Se, não foi observada nenhuma vantagem trabalhar com planejamento experimental, pois os valores obtidos por esse procedimento não se apresentaram adequados, mesmo sabendo que esse tipo de otimização é mais rápida, torna possível o conhecimento da interações entre as

variáveis e é bastante eficaz para outros tipos de estudos. Já para Cr, trabalhar com o planejamento experimental mostrou ser vantajoso, pois com apenas 40 experimentos foi possível estudar 6 variáveis, além da interação entre as mesmas. Entretanto, mostrou os mesmos resultados que a otimização univariada, logo, é possível afirmar que, para quem não possui um programa para tratar os dados dos planejamentos, é possível continuar trabalhando com a otimização univariada, pois fornece resultados confiáveis tanto quanto a otimização multivariada para esse tipo de estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. A. Prado, Desenvolvimento e comparação de técnicas analíticas, cromatografia a líquido de alta eficiência e eletroforese capilar, na determinação de corantes artificiais. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- [2] C. A Lindino, A. C. Gonçalves Junior, G. G. O. Schreiner, J. S. Schreiner, L. O. de Farina, Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. *Acta Scientiarum Technology* 16 (2001) 1202-1205.
- [3] P. Viñas, M. Pardo-Martínez, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Rapid determination of mercury in food colorants using electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sample introduction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, (2002) 949-954.
- [4] P. Viñas, M. Pardo-Martínez, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Slurry atomization for the determination of arsenic, cadmium and lead in food colourants using electrothermal atomic absorption spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 50,(2002) 949-954.
- [5] ANVISA, http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/index_99.htm# acessado em 20/08/2011.
- [6] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
- [7] Resolução nº 04 - CNS/MS, 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das tabelas I, III, IV e V referentes a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III, e VII, todas do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. *Diário Oficial da União, Brasília*, 19 dez. 1988.
- [8] B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [9] P. C. Aleixo, J. A. Nóbrega, D. Santos Júnior. R. C. S. Muller, Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, *Química Nova* 23 (1999) 310-312.
- [10] P. Olmedo, A. Pla, A. F. Hernández, O. López-Guarnido, L. Rodrigo, F. Gil, Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 659 (2010) 60-67.
- [11] O. Acar, Determination of cadmium, copper and lead in soils, sediments and sea water samples by ETAAS using a Sc + Pd + NH₄NO₃ chemical modifier, *Talanta* 65 (2005) 672–677.

-
- [12] M. V. Fariñas, J. B. García, S. G. Martín, R. M. P. Crecente, C. H. Latorre, Determination of Cr and Ni in *Orujo* spirit samples by ETAAS using different chemical modifiers, *Food Chemistry* 110 (2008) 177–186.
- [13] N. M. Hepp, Spectrometric determination of chromium in FD&C blue no. 1 by x-ray fluorescence, *Journal of AOAC International* 79 (1996) 1189-1190.
- [14] T. A. Altman, FDA and USDA Nutrition Labeling Guide: Decision diagrams, checklist, and regulations. Chapter 5: Nutrients Content Claims, section: Claiming Good Source, High, More or Lean. Ed. Technomic Publishing Co. Lancaster, p. 5.12, 1998.
- [15] M. A. Prado, H. T. Godoy, Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, *Química Nova* 30 (2007) 268-273.
- [16] Os corantes alimentícios, *Aditivos e Ingredientes* 62 (2010) 28-39.
- [17] N. M. Hepp, Arsenic determination in certifiable color additives by dry ashing followed by hydride generation atomic absorption, *Journal of AOAC International* 82 (1999) 327-330.
- [18] N. M. Hepp, A. M. Cargill, W. B. Shields, Automated Microwave Determination of Certifiable Color Additives for Determination by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometric, *Journal of AOAC International* 84 (2001) 117-122.
- [19] V. M. C. Dias, Quantificação de baixos teores de selênio em alimentos por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- [20] M. M. Sena, Aplicação de métodos quimiométricos na especificação de cromo (VI) em solução aquosa. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- [21] E. Matoso, Pré-concentração de Pb e Cu com fosfato de zircônio e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- [22] A. I. B. Paninho, Análise da concentração de chumbo em sangue de ratos Wistar sujeitos a uma exposição continuada, Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- [23] P. R. M. Correia, C. S. Nomura; P. V Oliveira, Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas. *Revista Analytica* 5 (2003) 52-59.
- [24] A. P. Anjos, Estudo de modificadores químicos e superfícies modificadas para a determinação de estanho por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, 1997.

-
- [25] R. E. S. Froes, C. C. Windmoller, J. B. B. Silva, Emprego da modificação química permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, *Revista Analytica* 23 (2006) 32-43.
- [26] L. Bianchin, Uso de modificadores químicos permanentes na determinação de cádmio em suspensão de carvão por GFAAS convencional e de alta resolução. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 2005.
- [27] E. C Lima, F. J. Krug, K. W. Jackson, Evaluation of tungsten–rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead, and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 53 (1998) 1791-1804.
- [28] C. R. Rosa, G. P. G. Freschi, M. Moraes, J. A. Gomes Neto, J. A. Nóbrega, A. R. A. Nogueira, Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry* 79 (2002) 517-523.
- [29] C. R. Rosa, M. Moraes, J. A. Gomes Neto, J. A. Nóbrega, A. R. A. Nogueira, L. V. Sacramento, Tungsten permanent chemical modifier for fast estimation of Se contents in soil by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 3920-3923.
- [30] S. Theodorolea, N. S. Thomaidis, E. Piperaki, Determination of selenium in human milk by electrothermal atomic absorption spectrometry and chemical modification, *Analytica Chimica Acta* 547 (2005) 132–137.
- [31] J. González-Nieto, J. F. López-Sánchez, R. Rubio, Comparison of chemical modifiers for selenium determination in soil aqua regia extracts by ZETAAS, *Talanta* 69 (2006) 1118–1122.
- [32] R. A. de Sousa, M. C. Santos, N. Baccan, S. Cadore, Determination of selenium in liquid dietetic sweeteners by GF AAS, *Food Analytical Methods* 3 (2010) 31-35.
- [33] H. Bertelsmann, A. Kyriakopoulos, M. Oezaslan, M. Hammadeh, D. Behne, Direct determination of selenium in sub-milligram amounts of human sperm nuclei by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchemical Journal* 85 (2007) 239-243.
- [34] C. V. S. Iggli, D. Bohrer, S. Noremborg, P. C. do Nascimento, L. M. de Carvalho, S. L. Vieira, R. N. Reis, Surfactant/oil/water system for the determination of selenium in eggs by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 64 (2009) 605-609.
- [35] K. Shrivastava, D. K. Patel, Ultrasound assisted-hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of selenium in vegetable and fruit samples by using GF-AAS, *Food Chemistry* 124 (2011) 1673-1677.

-
- [36] E. J. Daftsis, G. A. Zachariadis, Analytical performance of ETAAS method for Cd, Co, Cr and Pb determination in blood fractions samples, *Talanta* 71 (2007) 722–730.
- [37] R. Dobrowolski, Determination of Ni and Cr in soils by slurry graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 51 (1996) 221–227.
- [38] M. Felipe-Sotelo, A. Carlosena, J. M. Andrade, M. J. Cal-Prieto, E. Fernández, D. Prada, Slurry-based procedures to determine chromium, nickel and vanadium in complex matrices by ETAAS, *Microchemical Journal* 81 (2005) 217–224.
- [39] F. A. Lobo, D. Goveia, A. P. de Oliveira, E. R. Pereira-Filho, L. F. Fraceto, N. L. Dias Filho, A. H. Rosa, Comparison of the univariate and multivariate methods in the optimization of experimental conditions for determining Cu, Pb, Ni and Cd in biodiesel by GFAAS, *Fuel* 88 (2009) 1907–1914.
- [40] Z. Kılıç, E. Kenduzler, O. Acar, Determination of lead and copper in chewing gum samples by electrothermal-flame atomic absorption spectrometry using various chemical modifiers and arsenic by hydride generation, *Food Chemistry* 77 (2002) 85–92.
- [41] S. Soriano, Avaliação de diferentes estratégias para o tratamento de amostras de suplementos multivitamínicos/multiminerais visando a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal Fluminense, 2006.
- [42] M. A. Z. Arruda, R. E. Santelli, Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte, *Química Nova* 6 (1997) 638–643.
- [43] M. J. A. Dutra, D. M. Santos, N. M. M. Coelho, Comparação de procedimentos analíticos para preparo de amostras para determinação de cálcio e magnésio em leite, *Revista Analítica* 12 (2004) 36–40.
- [44] A. Abu-Samra, J. S. Morris, S. R. Koirtiyohann, *Analytical Chemistry* 47 (1975) 1475.
- [45] R. A. Sousa, A. S. Ribeiro, M. A. Vieira, A. J. Curtius, N. Baccan, S. Cadore, Determination of trace elements in liquid aspartame sweeteners by ICP OES and ICP-MS following acid digestion, *Microchimica Acta* 159 (2007) 241–246.
- [46] J. Frank, M. Krachler, W. Shotyk, Direct determination of arsenic in acid digests of plant and peat samples using HG-AAS and ICP-SF-MS, *Analytica Chimica Acta* 530 (2005) 307–316.
- [47] A. Gonçalves, J. R. Domínguez, J. Alvarado, Determination of Pd, Pt and Rh in vehicles escape fumes by GF-AAS and ICP-OES, *Talanta* 75 (2008) 523–527.
- [48] A. Q. Shah, T. G. Kazi, J. A. Baig, M. B. Arain, H. I. A., G. A. Kandhro, S. K. Wadhwa, N. F. Kolachi, Determination of inorganic arsenic species (As^{3+} and As^{5+}) in muscle tissues of fish species by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS), *Food Chemistry* 119 (2010) 840–844.

-
- [49] J. C. S. Barboza, A. A. Serra, Ultra-som (I): Influência do ultra-som na química, *Química Nova* 15 (1992) 302-316.
- [50] K. Ashley, R. N. Andrews, L. Cavazos, M. Demange, Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 (2001) 1147–1153.
- [51] I. Lavilla, P. Vilas, C. Bendicho, Fast determination of arsenic, selenium, nickel and vanadium in fish and shellfish by electrothermal atomic absorption spectrometry following ultrasound-assisted extraction, *Food Chemistry* 106 (2008) 403–409
- [52] J.L. Capelo, A.V. Filgueiras, I. Lavilla, C. Bendicho, Solid–liquid extraction of copper from slurried samples using high intensity probe sonication for electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 50 (1999) 905–911.
- [53] M. C. Santos, J. A. Nóbrega, N. Baccan, S. Cadore, Determination of toxic elements in plastics from waste electrical and electronic equipment by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 81 (2010) 1781–1787.
- [54] A. I. Puig, J. I. Alvarado, Evaluation of four sample treatments for determination of platinum in automotive catalytic converters by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 61 (2006) 1050–1053.
- [55] L. M. G. Santos, R. G. O. Araujo, B. Welz, S. C. Jacob, M. G. R. Vale, H. Becker-Ross, Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 78 (2009) 577–583.
- [56] I. N. B. Castilho, B. Welz, M. G. R. Vale, J. B. Andrade, P. Smichowski, A. A. Shaltout, L. Colares, E. Carasek, Comparison of three different sample preparation procedures for the determination of traffic-related elements in airborne particulate matter collected on glass fiber filters, article in press *Talanta* (I.N.B. Castilho, et al., *Talanta* (2011), doi:10.1016/j.talanta.2011.11.066).
- [57] M. A. Vieira, B. Welz, A. J. Curtius, Determination of arsenic in sediments, coal and fly ash slurries after ultrasonic treatment by hydride generation atomic absorption spectrometry and trapping in an iridium-treated graphite tube, *Spectrochimica Acta Part B* 57 (2002) 2057-2067.
- [58] V. Thomsen, G. Roberts, K. Burgess, The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry, *Spectroscopy* 15 (2000) 33-35.
- [59] E. Bulska, K. Pyrzyńska, Comparison of chemical modifiers for the determination of selenium by electrothermal atomic-absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 52 (1997) 1283-1291.
- [60] M. Bettinelli, U. Baroni, N. Pastorelli, Determination of arsenic, cadmium, lead, antimony, selenium and thallium in coal fly ash using the stabilised temperature platform

furnace and Zeeman-effect background correction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 3 (1988) 1005-1011.

[61] R. A. Zanão, F. Barbosa, S. S. Souza, F. J. Krug, A. L. Abdalla, Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W–Rh-coated platform and co-injection of Rh as thermal stabilizer, *Spectrochimica Acta Part B* 57 (2002) 291–301.

[62] P. C. Aleixo, J. A. Nóbrega, Direct determination of iron and selenium in bovine milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry* 83 (2003) 457–462.

[63] R. D. Ediger, Atomic absorption analysis with graphite furnace using matrix modification, *Atomic Absorption Newsletter* 14 (1975) 127-130.

[64] S. R. Oliveira, A. P. Oliveira, J. A. Gomes Neto, Tungsten permanent chemical modifier with co-injection of $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ for direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry* 105 (2007) 236–241.

[65] P. Török, M. Žemberyová, Utilization of $\text{W}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ modifiers for the direct determination of As and Sb in soils, sewage sludge and sediments by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 65 (2010) 291–296.

[66] R. Dobrowolski, A. Adamczyk, M. Otto, J. Dobrzyńska, Determination of antimony in sediments and soils by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using a permanent chemical modifier, *Spectrochimica Acta Part B* 66 (2011) 493–499.