

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

NATÁLIA KOHLRAUSCH VERNETTI DOS SANTOS

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA E SEQUENCIAL DE CÁDMIO, NÍQUEL E  
FERRO EM SEMENTES POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE  
ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE  
EMPREGANDO ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

NATÁLIA KOHLRAUSCH VERNETTI DOS SANTOS

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA E SEQUENCIAL DE CÁDMIO, NÍQUEL E  
FERRO EM SEMENTES POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE  
ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE  
EMPREGANDO ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à  
atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de  
Curso - QUI” do Curso de Química, como  
requisito parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Química

Profa. Dra. Morgana Bazzan Dessuy  
Orientadora

Porto Alegre  
2019

*Dedico este trabalho aos meus pais.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Rejane e João Carlos, e ao meu irmão, Fernando, por todo apoio, compreensão e carinho.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Morgana Dessuy, por todo apoio, orientação e por acreditar em mim para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Análise de Traços da UFRGS por me acolherem, pelos muitos ensinamentos e sorrisos.

À Professora Dr. Maria Goreti, por disponibilizar seu laboratório e recursos para a realização deste trabalho.

À todos os amigos, por estarem presentes ao longo da minha trajetória no curso proporcionando momentos de descontração essenciais.

## RESUMO

A determinação multielementar é uma notável inovação na técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, podendo ser realizada de forma sequencial ou simultânea. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para a determinação de três elementos, sendo primeiramente medido Cd e, em sequência, Fe e Ni, simultaneamente, a partir de uma única alíquota de amostra, empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por forno de grafite (HR-CS GF AAS) e análise direta de sólidos. Como amostra, foram escolhidas sementes de abóbora, girassol, chia, amaranto e quinoa. Estas têm sido cada vez mais consumidas como alimento, e a determinação de elementos químicos essenciais ou que têm efeitos tóxicos no corpo humano é muito importante para a avaliação do estado nutricional e tóxico das mesmas. Para a determinação de Cd, utilizou-se a linha principal, 228,802 nm, e para a determinação simultânea utilizou-se os comprimentos de onda de 232,003 nm, para Ni e 232,036 nm para Fe, correspondendo a 100 e 1,4% de sensibilidade relativa, respectivamente. Realizou-se estudos de otimização das temperaturas de pirólise e de atomização, tanto para amostra quanto para uma solução padrão. Para o Cd, as condições escolhidas foram pirólise de 600 °C e atomização de 1500 °C. Para o Ni e o Fe, a temperatura de 2500 °C foi escolhida para atomização. Otimizou-se a massa de modificador químico, sendo empregado 5 µg de Pd e 3 µg de Mg. Foram realizados estudos de massa de amostra e de homogeneidade. Os limites de detecção ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e massa característica (pg) obtidos para o método foram, respectivamente, 0,41 e 0,47 para o Cd; 14 e 9,5 para o Ni; e 74 e 612 para o Fe. O método é preciso e exato visto que se obteve valores de RSD abaixo de 20% para todas as amostras e que os valores encontrados para o material de referência certificado foram concordantes com os certificados. Ao aplicar o método nas amostras escolhidas, somente a semente de abóbora não pôde ter os analitos determinados devido a uma interferência espectral.

Palavras-chave: metais, sementes, determinação multielementar, HR-CS SS-GF AAS.

## ABSTRACT

The multi-element determination is a notable innovation in the technique of high resolution and continuous source atomic absorption spectrometry, which can be performed sequentially or simultaneously. The objective of this work was to develop an analytical method for the determination of three elements, firstly measuring Cd and, in sequence, Fe and Ni, simultaneously, from a single aliquot of sample, using the technique of high resolution continuous source atomic absorption spectrometry with graphite furnace (HR-CS GF AAS) by direct analysis of solids. As sample, seeds of pumpkin, sunflower, chia, amaranth and quinoa were chosen. These have been increasingly consumed as food, and the determination of essential or toxic chemical elements on the seeds is very important for the evaluation of the nutritional and toxic state of them. For the determination of Cd the main line, at 228.802 nm, was used and for the simultaneous determination, the lines at 232.003 nm and 232.036 nm were used for Ni and Fe, corresponding to 100 and 1.4% of relative sensitivity, respectively. Pyrolysis and atomization temperatures were optimized for both sample and standard solution. For Cd, the best conditions were pyrolysis at 600 °C and atomization at 1500 °C. For Ni and Fe, the temperature of 2500 °C was chosen for atomization. As chemical modifier was used a mixture of 5 µg Pd and 3 µg Mg. Sampling mass and homogeneity studies were performed. The limits of detection ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and characteristic mass ( $\text{pg}$ ) obtained for the method were, respectively, 0.41 and 0.47 for the Cd; 14 and 9.5 for Ni; and 74 and 612 for Fe. The method is accurate since the RSD values were below 20% for all analyzed samples and the obtained values for certified reference material were in agreement with the certified ones. When applying the method to the chosen samples, only the pumpkin seed cannot have the analytes determined due to a spectral interference.

Keywords: metals, seeds, multi-element determination, HR-CS SS-GF AAS.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programa de aquecimento do forno de grafite. ....	29
Tabela 2 – Estudo da influência do tamanho de partícula no sinal de Aint normalizado para 1 mg da amostra de quinoa. Média e desvio padrão relativo (RSD) para número de replicatas n=6. ....	37
Tabela 3 – Valores de He ( $\text{mg}^{1/2}$ ) e RSD obtidos para a determinação de cada um dos três analitos em sementes de girassol torradas em três faixas de massa distintas, sendo n=10 para cada intervalo. ....	38
Tabela 4 – Parâmetros de mérito para a determinação de Cd, Ni e Fe em sementes por HR-CS SS GF AAS. LOD e LOQ foram calculados para o máximo de amostra utilizado (2 mg). ....	39
Tabela 5 – Determinação de cádmio, níquel e ferro, em $\text{mg kg}^{-1}$ (concentração $\pm$ desvio padrão) no CRM NIST SRM 1573a e os valores de $t_{\text{calculado}}$ para o teste t-Student (nível de confiança de 95%: $t_{\text{crítico}} = 2,57$ ), sendo n=5. ....	40
Tabela 6 – Concentrações de cádmio, níquel e ferro em amostras de sementes seguidas de desvio padrão (concentração $\pm$ desvio padrão), bem como RSD (n=5). ....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês: <i>atomic absorption spectrometry</i> )
CS	Fonte contínua (do inglês: <i>continuum source</i> )
LS	Fonte de linha (do inglês: <i>line source</i> )
HR-CS AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (do inglês: <i>high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry</i> )
CCD	Dispositivo de carga acoplada
GF	Forno de grafite (do inglês: <i>grafite furnace</i> )
STPF	Forno com plataforma e temperatura estabilizada (do inglês: <i>stabilized temperature grafite furnace</i> )
SS	Análise direta de sólidos (do inglês: <i>solid sampling</i> )
HR-CS SS-GF AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite por análise direta de sólidos (do inglês: <i>high-resolution continuum source solid sampling graphite furnace AAS</i> ).
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês: <i>relative standard deviation</i> )
Aint	Sinal de absorvância integrada
T <sub>p</sub>	Temperatura de pirólise
T <sub>a</sub>	Temperatura de atomização
LOD	Limite de detecção (do inglês: <i>limit of detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do inglês: <i>limit of quantification</i> )
m <sub>0</sub>	Massa característica
CRM	Material de referência certificado (do inglês: <i>certified reference material</i> )



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 GERAL.....	12
2.2 ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
3.1 SEMENTES .....	13
<b>3.1.1 Elementos Traço na Nutrição</b> .....	<b>14</b>
3.1.1.1 Ferro .....	15
3.1.1.2 Níquel .....	16
3.1.1.3 Cádmio .....	16
<b>3.1.2 Legislação de Contaminantes</b> .....	<b>17</b>
3.2 DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	17
<b>3.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.2 Forno de Grafite</b> .....	<b>20</b>
3.2.2.1 Modificadores Químicos .....	21
3.2.2.2 Análise Direta de Sólidos.....	22
<b>3.2.3 Determinação Multielementar</b> .....	<b>23</b>
3.2.3.1 Determinação Simultânea .....	24
3.2.3.2 Determinação Sequencial.....	25
<b>4 EXPERIMENTAL</b> .....	<b>27</b>
4.1 MATERIAIS E REAGENTES .....	27
4.2 INSTRUMENTAÇÃO .....	27
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	28
4.4 PROCEDIMENTO DE MEDIDA .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>

5.1 ESCOLHA DOS COMPRIMENTOS DE ONDA .....	30
5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROGRAMA DE TEMPERATURA.....	30
<b>5.2.1 Modificador Químico .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.2 Pirólise.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2.3 Atomização.....</b>	<b>33</b>
5.3 TEOR DE UMIDADE.....	35
5.4 ESTUDO DE MASSA DE AMOSTRA.....	35
5.5 HOMOGENEIDADE .....	36
5.6 PARÂMETROS DE MÉRITO .....	38
<b>5.6.1 Análise de Material de Referência Certificado .....</b>	<b>39</b>
5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS .....	40
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de sementes é recomendado por nutricionistas para se obter uma dieta saudável e balanceada. Nas últimas décadas, sementes como as de abóbora, amaranto, chia, girassol e quinoa vêm ganhando destaque, sendo amplamente utilizadas na culinária em muitos países.

Sementes contêm microminerais essenciais para a saúde humana, bem como elementos potencialmente tóxicos. Microminerais são alguns elementos químicos que desempenham diversas funções metabólicas no organismo. São necessários aos seres humanos em pequenas quantidades e adquiridos por meio de dietas balanceadas e diversificadas. O consumo de alimentos é a principal rota de exposição da população geral aos metais. Portanto, é importante que a composição inorgânica dos alimentos seja conhecida. Muitos trabalhos foram desenvolvidos visando definir a composição orgânica de sementes e seus óleos, porém são poucos aqueles que elucidam a composição mineral das mesmas.

Para a determinação de micronutrientes e elementos potencialmente tóxicos, são necessárias técnicas com alta sensibilidade. A técnica escolhida para o desenvolvimento de metodologia foi a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite. Esta técnica é muito adequada para análise direta de sólidos, pois pode-se analisar pequenas quantidades de amostras com boa seletividade e sensibilidade. A principal vantagem em avaliar metais em sementes por análise direta de sólidos é a simplificação no preparo da amostra, sendo menor a periculosidade por não utilizar reagentes tóxicos ou corrosivos e devido à mínima geração de resíduos, o que permite classificar o método como limpo. Além disso, a técnica possibilita a análise multielementar, isto é, a determinação de mais de um analito a partir da mesma alíquota de amostra.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Propor um método analítico para a determinação multielementar de cádmio, níquel e ferro em sementes comestíveis empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite por análise direta de sólidos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a. Realizar uma revisão bibliográfica sobre quais foram as possibilidades exploradas na determinação multielementar através da técnica escolhida e em amostras de sementes.
- b. Utilizar soluções padrão aquosas para calibração através *(i)* da construção de curvas de pirólise e atomização dos três analitos, utilizando soluções padrão e amostra, e *(ii)* da investigação do uso de modificadores químicos.
- c. Avaliar a homogeneidade das amostras.
- d. Determinar os parâmetros de mérito: linearidade, massa característica, limites de detecção e de quantificação.
- e. Estabelecer a exatidão através da análise de material de referência certificado.
- f. Avaliar a precisão através do coeficiente de variação das amostras.
- g. Aplicar o método em amostras de sementes como de abóbora, amaranto, chia, girassol e quinoa, adquiridas em mercados do Rio Grande do Sul.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 SEMENTES

O interesse generalizado em alimentos saudáveis está levando a um maior consumo de novos alimentos. Nas últimas décadas, sementes como as de abóbora, amaranto, chia, girassol e quinoa vêm sendo amplamente utilizadas na culinária em muitos países, sendo recomendadas por nutricionistas para se obter uma dieta saudável e balanceada (VERSANTO; WINSTON; SUSAN, 2016). As sementes citadas têm crescente popularidade e faltam dados sobre seu conteúdo mineral. Sabendo-se que o consumo de alimentos é a principal rota de exposição da população geral aos metais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998), justifica-se a necessidade da avaliação nutricional e toxicológica de metais nas mesmas.

A quinoa (*Chenopodium quinoa*) e o amaranto (*Amaranthus* sp.) são de origem andina e considerados pseudocereais. Produzem sementes cuja aplicação é semelhante à dos cereais, porém, biologicamente, não pertencem à mesma classe (BELTON; TAYLOR, 2002). São consideradas culturas com grande variabilidade genética e, portanto, adaptadas a diversos habitats. Foram introduzidas em vários países fora da região andina e o interesse por estes pseudocereais pode ser explicado pelas suas propriedades como ingredientes funcionais sem glúten para pães, massas e produtos de confeitaria (NASCIMENTO et al., 2014).

A aplicação bem sucedida de pseudocereais andinos em alimentos isentos de glúten foi demonstrada em vários estudos e revista por pesquisadores da Universidade Nacional da Irlanda (ALVAREZ-JUBETE; ARENDT; GALLAGHER, 2010). Os autores demonstraram que uma dieta balanceada em proteínas, fibras, cálcio, ferro e vitamina E poderia ser obtida sempre que essas sementes andinas participassem da dieta, substituindo outros ingredientes sem glúten. Além disso, devido às características sensoriais, perfil de nutrientes e estabilidade, as formulações sem glúten baseadas em quinoa ou amaranto conferem uma textura similar às formulações à base de milho. Em paralelo, o sabor e o cheiro influenciam e reforçam as preferências do consumidor. Por conseguinte, o consumo de quinoa e amaranto tem crescido substancialmente em todo o mundo na última década.

A semente de quinoa possui na sua composição em torno de 71% de carboidratos, 13% de proteínas e 6% de lipídios (COMAI et al., 2007), semelhante à

de amaranto, que apresenta cerca de 60% de amido, 16% de proteína, e 5-8% de lipídios (DUARTE CORREA; JOKL; CARLSSON, 1986). A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) destacou a importância das culturas de quinoa e sua contribuição na alimentação mundial, e a Assembleia Geral das Nações Unidas designou o ano de 2013 como o Ano Internacional da Quinoa (ONU, 2012).

A chia (*Salvia hispanica*), é uma planta da América Central. Atualmente, não é cultivada em grande escala, mas merece atenção. As sementes apresentam uma composição nutricional que inclui alto teor de proteínas (19-23%), lipídios (30-33%), carboidratos (9-41%) e fibras (18-30%). Tem se mostrado uma excelente fonte de ácidos graxos poli-insaturados e o ômega-3 representa 75% do teor total do seu óleo (MUÑOZ et al., 2013). No entanto, sua composição mineral é menos conhecida (BOLAÑOS; MARCHEVSKY; CAMIÑA, 2016). Embora não haja muitos estudos publicados sobre os benefícios para a saúde do consumo de sementes de chia, há evidências de que ela melhora os fatores de risco para doenças cardiovasculares, diminuindo colesterol, triglicerídeos e pressão arterial (RUBIO et al., 2018).

A semente de abóbora (*Cucurbita* sp.) é um alimento nutritivo com alto teor de óleo (50%) e proteínas (35%). Contém níveis significativos de antioxidantes que têm sido associados a um risco reduzido de alguns tipos de câncer (MERU et al., 2018). O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma importante cultura oleaginosa originária da América do Norte. O teor de óleo da semente de girassol pode variar de 35 a 50% e consiste principalmente de ácidos graxos insaturados, o que a tornam uma opção desejável para o consumo humano visando uma alimentação saudável (EBRAHIMIAN et al., 2019). Atualmente, lanches de sementes de abóbora e girassol são populares em lojas de varejo, em misturas com várias nozes, sementes e frutas secas. Também estão presentes como ingredientes no café da manhã, em cereais e pães.

### 3.1.1 Elementos Traço na Nutrição

Define-se como macromineral todos os minerais que estão presentes no organismo em proporção superior à 0,05%. Os sete macrominerais são Ca, P, K, S, Na, Cl e Mg. Os microminerais, também chamados de elementos traço, são aqueles necessários em pequenas quantidades diárias (mg ou µg) para a manutenção do

funcionamento adequado das células e do metabolismo. Alguns microminerais têm sua essencialidade bem definida para o ser humano, enquanto a necessidade alimentar de outros ainda está em discussão. Uma alimentação balanceada, com alimentos variados, é a fonte para adquirir estes elementos (DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

Por possuírem alta reatividade química e biológica, os microminerais podem ser tóxicos dependendo da dose e do tempo de exposição, entre outros fatores. Portanto, um elemento traço essencial pode vir a ser um contaminante quando se encontra nos alimentos acima dos níveis nutricionalmente desejáveis. Há também elementos que mesmo presentes em concentrações extremamente baixas, desempenham um papel altamente tóxico para o ser humano, não tendo sido encontrada uma função essencial até os dias atuais. Os elementos tóxicos ou contaminantes não se encontram de modo uniforme nos alimentos, e variam para o mesmo tipo de alimento conforme a região. Além disso, o padrão de consumo alimentar também varia de modo considerável conforme a região. Um alimento pode contribuir de forma significativa para a ingestão de um contaminante ou elemento tóxico devido à presença intrínseca de concentrações elevadas dos mesmos, ao elevado consumo, a uma contaminação ambiental ou a uma combinação destes fatores (COZZOLINO, 2007).

#### 3.1.1.1 Ferro

O ferro é considerado um elemento traço essencial para o ser humano. Exerce função estrutural na hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio e gás carbônico no sangue. Também compõe enzimas e tem papel importante em processos metabólicos.

O ferro está presente nas carnes vermelhas e vísceras de animais e é biologicamente mais disponível quando comparado aos vegetais. De forma geral, os vegetais são ricos em ferro, porém as fibras e outros compostos presentes tornam o ferro menos absorvível pelo intestino. Sendo assim, o tipo de dieta influencia muito na biodisponibilidade do ferro ingerido.

Sua perda se dá pelas fezes, suor, cabelos e descamação da pele. Para mulheres, há perda também pela menstruação e quando gestante, na transferência pela placenta para o feto. Enquanto um homem adulto perde cerca de 1 mg de ferro

por dia, uma mulher adulta com menstruação normal perde cerca de 1,5 a 2 mg, e uma gestante perde 3 mg por dia (DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

Como somente 5 a 15% do total de ferro ingerido é absorvido, as recomendações de ingestão diária excedem a quantidade que precisa ser reposta para que haja a compensação necessária (COZZOLINO, 2007). Sendo assim, de acordo com a FAO/OMS, a recomendação de ingestão de ferro diária, ao considerar uma dieta com 10% de biodisponibilidade, é de 13,7 mg para um homem adulto e de 29,4 mg para uma mulher adulta (FAO; OMS, 2001).

#### 3.1.1.2 Níquel

O níquel é considerado um elemento traço possivelmente essencial. A sua presença em enzimas de vegetais é bem definida e acredita-se que ele funcione de modo similar em animais. Todavia, não há estudos que comprovem isso e a sua essencialidade ainda é incerta. A ação tóxica do níquel se dá principalmente por irritação gastrointestinal e não por toxicidade inerente. Pode ocasionar irritação cutânea nos indivíduos com maior sensibilidade.

A ingestão de níquel na dieta varia de acordo com a proporção de alimentos de origem animal (baixo teor de níquel) e vegetal (alto teor de níquel) consumidos. Aproximadamente metade da ingestão diária total é usualmente derivada do consumo de pães, cereais e bebidas, o que reforça a importância de determinar a concentração de níquel em sementes. É difícil estipular valores para a necessidade e ingestão toleráveis devido à escassez de dados. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, é razoável sugerir que a necessidade de ingestão é de menos de 100 µg por dia para adultos, e o limiar de toxicidade pode ser estabelecido em menos de 600 µg por dia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998).

#### 3.1.1.3 Cádmio

O cádmio é considerado um elemento traço potencialmente tóxico. Exceto pelas comunidades expostas a altos níveis de poluição por efluentes ou emissões industriais ricas em metais pesados, é evidente que para a maioria dos indivíduos a principal fonte de elementos potencialmente tóxicos é a alimentação. As condições geológicas e do solo, bem como a extensão na qual estas são modificadas por



ações humanas, podem ter uma influência significativa sobre o conteúdo de cádmio nos alimentos. Altos teores de cádmio nos solos e plantações estão normalmente associados à sua presença em xistos e outras rochas sedimentárias em associação a minerais ricos tanto em cádmio quanto em zinco. Cereais e outros vegetais representam cerca de 50% da ingestão de cádmio, que está na faixa de 10 – 50 µg por dia em adultos.

O cádmio está presente na maioria dos órgãos humanos, mas apresenta maior afinidade pelos rins, onde sua concentração é maior e há acúmulo com a idade. Assim, sua toxicidade ocasiona lesão renal e esquelética, esta associada à perda urinária excessiva de cálcio vinculada à intoxicação por cádmio. O Conselho de Especialistas da Junta FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares recomenda que 7 µg por kg de peso corpóreo devem ser considerados como a ingestão máxima semanal tolerável de cádmio. Para uma pessoa de 65 kg, isso representa uma ingestão de 65 µg por dia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998).

### **3.1.2 Legislação de Contaminantes**

A resolução da diretoria colegiada Nº 42, de 29 de agosto de 2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece limites de contaminantes inorgânicos para três categorias de sementes: cereais, leguminosas e nozes (ANVISA, 2013). No entanto, as sementes inicialmente citadas não se enquadram claramente em nenhuma das categorias da legislação, não havendo um controle de contaminantes inorgânicos nas mesmas.

## **3.2 DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Para a determinação de micronutrientes e elementos potencialmente tóxicos, são necessárias técnicas com alta sensibilidade, como a espectrometria de absorção atômica (AAS).

Ela é uma técnica largamente difundida e empregada para a determinação de elementos traço nas mais diversas amostras. A mesma se baseia no fenômeno de absorção de radiação de frequência específica por átomos livres (no estado gasoso), os quais são promovidos a um estado excitado de energia e depois relaxam para o

estado fundamental. Ao absorver a energia para ser excitado, um detector registra uma atenuação na intensidade da radiação emitida pela fonte, que é relacionada à concentração do analito presente na amostra através da lei de Beer.

Em instrumentos convencionais, usualmente uma fonte de radiação específica para cada elemento é utilizada e apenas as linhas do próprio elemento são emitidas pela fonte. Os primeiros espectrômetros de absorção atômica, desenvolvidos na segunda metade do século XIX, utilizavam uma fonte contínua (CS), que abrange uma ampla faixa do espectro. No entanto, a resolução alcançada com fonte de linha não era atingida nem com os melhores monocromadores da época ao usar fonte contínua. Assim, a fonte de linha se destacou. As fontes de linha (LS), como o próprio nome sugere, consistem em lâmpadas especialmente desenvolvidas para emitir radiação com largura de alguns picômetros, específica para cada elemento, o que torna a técnica altamente seletiva e dispensa o uso de monocromadores de alta resolução. Entre as limitações inerentes à LS AAS, há o fato de ser possível a determinação de um único elemento por vez, o que torna o procedimento limitado. Além disso, esta técnica requer uma coleção de lâmpadas (em geral, uma para cada analito), que são caras e têm vidas úteis limitadas. A absorção é medida apenas sobre intervalos espectrais consideravelmente estreitos, correspondentes à largura da linha atômica emitida pela fonte de radiação, o que restringe consideravelmente a informação disponível sobre o ambiente espectral. Entretanto, a atenuação medida na linha analítica pode ser causada não somente pela absorção por átomos, mas também por moléculas e pela presença de partículas que espalham a radiação, provenientes de constituintes da matriz (BORGES et al., 2005).

A ideia de utilizar CS AAS nunca foi completamente esquecida (WELZ; BECKER-ROSS; HEITMANN, 2005). O primeiro instrumento de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), cuja configuração é a mais próxima da atualmente utilizada, foi descrito em 1996 por Heitmann *et al.* (HEITMANN et al., 1996). A técnica possui diversas vantagens, como a possibilidade de visualização do ambiente espectral a cerca de 0,2 a 0,3 nm em ambos lados da linha analítica e o uso de uma única fonte de radiação para todos os elementos cuja determinação é possível por AAS (BORGES et al., 2005). Assim, a alta resolução e o uso de uma única fonte de radiação, entre outras

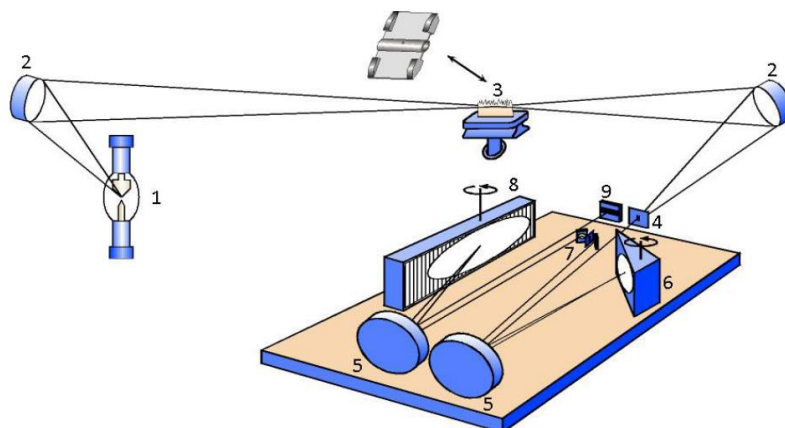
vantagens, fazem da HR-CS AAS uma excelente ferramenta para desenvolvimento de métodos analíticos, sendo esta a utilizada neste trabalho.

### 3.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua

A HR-CS AAS possui excelente seletividade e sensibilidade. A técnica também se destaca por permitir a determinação multielementar sequencial e/ou simultânea de alguns elementos.

O equipamento (Figura 1) conta com uma lâmpada de arco-curto de xenônio de alta intensidade (emissão de faixa contínua entre 190 e 850 nm), um monocromador duplo de alta resolução, que conta com um prisma como pré-dispersor e uma rede de difração *echelle* que fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado, e um detector de carga acoplada (CCD) que possui 588 *pixels*, que funcionam como detectores individuais, sendo 200 utilizados para fins analíticos e o restante para correções internas. Isso permite observar o ambiente espectral ao redor da linha analítica (janela espectral). O resultado é um gráfico tridimensional, relacionando a absorvância em função do comprimento de onda e do tempo.

Figura 1 - Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS). No esquema, têm-se: (1) lâmpada de arco curto de Xe; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabolóides; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede *echelle* e (9) detector CCD.



Há diversas vantagens associadas à HR-CS AAS. A alta intensidade de emissão da lâmpada de arco curto de Xe implica em uma melhora significativa na razão sinal/ruído e o uso de um sistema de feixe duplo simultâneo, capaz de corrigir flutuações de intensidade da lâmpada e na transmissão de radiação, não prejudica essa razão. Toda a região espectral na vizinhança da linha analítica torna-se visível, permitindo obter muito mais informações, por exemplo a respeito do fundo, indisponíveis em aparelhos convencionais de AAS. O *software* permite o processamento pós-leitura dos sinais, permitindo alterar os *pixels* usados para a avaliação do sinal e redefinir limites de integração. Estas são apenas algumas das vantagens que a técnica apresenta e resultam em um melhor desempenho analítico na determinação de elementos traço em amostras complexas (BORGES et al., 2005). Além disso, há a capacidade de realizar determinações multielementares, sequenciais e/ou simultâneas, tópico que será abordado com mais detalhes adiante.

### **3.2.2 Forno de Grafite**

O forno de grafite (GF) é o atomizador através do qual se dá a atomização eletrotérmica de amostras, que resulta em uma elevada sensibilidade devido ao tempo de permanência dos átomos no caminho óptico relativamente longo (os átomos ficam confinados em um pequeno volume) e à grande eficiência na introdução da amostra e atomização. A alta sensibilidade é obtida para volumes pequenos de amostra, sendo este o maior destaque da técnica. O atomizador é feito de eletrografite policristalino e recoberto com grafite pirolítico para encobrir os poros no grafite e amenizar alguns efeitos de matriz. O aquecimento se dá por resistência à passagem de alta corrente elétrica. Após a introdução da amostra, é aplicado um programa de aquecimento no forno, que é composto basicamente pelas seguintes etapas: secagem, etapa na qual solvente e/ou umidade da amostra evaporam; pirólise, em que ocorre a eliminação da matriz da amostra; atomização, onde se aplica temperaturas mais altas, promovendo o analito à sua forma atômica gasosa; e limpeza, sob temperatura superior à da etapa de atomização para remoção de resíduos mais difíceis de serem vaporizados (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A GF AAS apresenta características que a elegem como uma das técnicas mais adequadas para análise direta de sólidos (WELZ; SPERLING, 1999). O programa de aquecimento permite o pré-tratamento térmico da amostra, sobretudo

durante a etapa de pirólise, o que facilita a remoção dos concomitantes que podem provocar interferências durante a atomização. Pode-se analisar pequenas quantidades de amostras com boa seletividade e sensibilidade. Os sólidos são pesados diretamente nas plataformas de grafite que são, posteriormente, introduzidas no atomizador eletrotérmico. A adequada otimização do programa de aquecimento, aliada ao uso de modificadores químicos, possibilita a calibração do equipamento com soluções aquosas (NOMURA; DA SILVA; OLIVEIRA, 2008).

### 3.2.2.1 Modificadores Químicos

A modificação do analito e da matriz se dá através da adição de um reagente, chamado de modificador químico, para converter o analito em uma fase de maior termoestabilidade, bem como aumentar a volatilidade de concomitantes. É uma importante parte integrante do conceito de forno com plataforma e temperatura estabilizada (STPF). O conceito STPF, desenvolvido por Slavin (SLAVIN; MANNING; CARNRICK, 1981) é um conjunto de condições que devem ser usadas para garantir determinações livres de interferência no forno de grafite. As condições STPF podem ser resumidas em: uso de fornos piroliticamente recobertos e aquecidos transversalmente; plataforma para atomização do analito; velocidade de aquecimento rápida durante a etapa de atomização; interrupção do fluxo de gás durante a atomização; uso da absorvância integrada nas medidas de sinais analíticos e o emprego de modificadores químicos.

A finalidade do uso de modificadores químicos em GF AAS é permitir o emprego de temperaturas de pirólise suficientemente elevadas para remover os concomitantes antes da fase de atomização sem perda de analito por volatilização. Conseqüentemente, um modificador eficiente reduz significativamente uma série de interferências espectrais como absorção da radiação por moléculas ou outros átomos de outros elementos e espalhamento da radiação por partículas dos concomitantes.

Para tornar a aplicação de modificadores possível, espera-se que um número de requisitos seja atendido, particularmente para o trabalho de rotina. Entre eles, pode-se citar: o analito deve ser estabilizado a uma temperatura de pirólise tão alta quanto possível para permitir a volatilização de concomitantes antes da atomização; o modificador deve ser aplicável ao maior número de elementos possível por

praticidade; o modificador deve estar disponível em alta pureza; não pode conter os analitos em concentrações mensuráveis; e não deve reduzir a vida útil dos tubos de grafite. O modificador misto de nitratos de paládio e magnésio foi considerado um modificador universal por Welz por satisfazer os pré-requisitos listados. (SCHLEMMER; WELZ, 1986).

Os modificadores químicos são comumente utilizados na análise direta de sólidos (SS) por GF AAS (SS-GF AAS). A adição de uma alíquota de modificador químico em solução sobre a amostra sólida é a forma mais usual de utilizá-lo, sendo essencial para garantir uma eliminação eficiente da matriz sem a perda de analitos voláteis.

### 3.2.2.2 Análise Direta de Sólidos

Usualmente, as amostras sólidas são convertidas em soluções aquosas por meio de procedimentos clássicos de preparo de amostra por via seca, como cinzas e fusão, ou por via úmida, como digestão e dissolução ácida em altas temperaturas. Erros sistemáticos devido à contaminação ou perdas por volatilização podem afetar diretamente a exatidão e a precisão dos resultados. Visto que a GF AAS é uma técnica destinada à determinação de traços e ultratraços de elementos, os cuidados no preparo das amostras tornam-se cruciais para o sucesso do método empregado (WELZ; SPERLING, 1999).

A determinação elementar a partir da SS-GF AAS apresenta algumas vantagens quando comparada aos procedimentos convencionais, como: minimização dos riscos de contaminação devido ao uso de quantidade reduzida ou nula de reagentes; minimização das perdas do analito por volatilização; menor periculosidade devido a não utilização de reagentes tóxicos ou corrosivos; minimização da geração de resíduos, o que permite classificar os métodos como limpos; e melhores limites de detecção, visto que as amostras não são diluídas. Além disso, a simplificação no preparo da amostra reduz o tempo gasto nessa etapa, aumentando a frequência analítica (NOMURA; DA SILVA; OLIVEIRA, 2008).

A despeito das vantagens da técnica, algumas dificuldades podem surgir dependendo da amostra, e podem ser um obstáculo para a aplicação. A possibilidade de analisar uma pequena quantidade de amostra pode implicar em problemas de homogeneidade e representatividade. Dessa forma, a vantagem de

trabalhar com massas pequenas representa na verdade um grande desafio para obter resultados precisos e exatos (PAUWELS; HOFMANN; VANDECASTEELE, 1994). Portanto, a homogeneidade é um fator importante. Esse parâmetro está relacionado com a natureza do material, a massa de amostra a ser utilizada e a concentração do analito. A heterogeneidade para pequenas massas de amostras pode ser associada à presença de partículas grandes “aglomeradas”. A redução do tamanho de partículas através da moagem é uma alternativa para tentar contornar esse problema (NOMURA; DA SILVA; OLIVEIRA, 2008). Kurfürst *et al.* introduziram o conceito de constante de homogeneidade,  $H_e$ , para pequenas massas de amostras através da equação 1 (KURFÜRST *et al.*, 1993), que representa a imprecisão relacionada ao erro de amostragem para uma unidade de massa (1 mg).

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

O erro de amostragem,  $S_H$ , para uma massa de amostra,  $m$  (em mg), pode ser obtido a partir dos valores de desvio padrão relativo (RSD) das medidas. Quando o fator de homogeneidade é menor que  $10 \text{ mg}^{1/2}$ , o material pode ser considerado suficientemente homogêneo (NOMURA; DA SILVA; OLIVEIRA, 2008).

### 3.2.3 Determinação Multielementar

Durante muito tempo, muitos trabalhos foram desenvolvidos para tornar a AAS uma técnica multielementar, na qual dois ou mais elementos químicos são determinados de forma simultânea ou sequencial.

A atual instrumentação HR-CS GF AAS traz algumas vantagens para determinações multielementares. A técnica se destaca por empregar de uma única fonte para todos os elementos, e a intensidade da fonte para todas essas linhas é aproximadamente a mesma. É possível visualizar o ambiente em torno da linha analítica, e há um sistema de detecção de múltiplas linhas de uma mesma janela analítica. Isso possibilita o desenvolvimento de estratégias para determinações multielementares sequenciais e simultâneas (FERREIRA *et al.*, 2018).

No entanto, apenas uma região espectral estreita pode ser monitorada simultaneamente com a instrumentação atualmente disponível. Assim, a análise multielementar simultânea é geralmente possível apenas para alguns elementos, que devem mostrar linhas adjacentes próximas. Esta é uma clara desvantagem quando comparada com outras técnicas analíticas, mas é de fato uma vantagem em

comparação com os dispositivos LS GF AAS. Assim, a técnica é particularmente útil nos casos em que o número de analitos é pequeno (RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014).

### 3.2.3.1 Determinação Simultânea

A quantificação simultânea de dois ou mais elementos é possível quando as suas linhas de absorção aparecem dentro da mesma janela espectral. Sendo assim, é necessário encontrar linhas atômicas dos analitos que estejam suficientemente próximas. A dificuldade em encontrar essas linhas depende dos analitos. Se os analitos possuírem muitas linhas, as chances de encontrar algumas que estão próximas suficiente aumentam. No entanto, nem todas as linhas mostram a mesma sensibilidade, e as linhas selecionadas devem ser adequadas para a concentração esperada na amostra. Este é um requisito severo, porque algumas soluções frequentemente usadas para adaptar a sensibilidade ao realizar determinações monoelementares, como diluir a amostra ou manter o fluxo de gás durante a etapa de atomização, podem não ser apropriadas para uma abordagem simultânea visto que terão efeito em todos os analitos.

Por conseguinte, as condições do forno devem ser consideradas. O ideal é que os analitos possuam comportamento térmico semelhante. Para estes casos, pode ser simples desenvolver um programa de temperatura e usar um modificador químico adequado para todos os analitos. No entanto, se o comportamento é muito distinto (por exemplo, a determinação simultânea de elementos voláteis e refratários), condições de compromisso precisam ser usadas. Isso não é um problema intransponível para desenvolver métodos simultâneos. Tais métodos requerem o uso de um modificador químico em quantidade suficiente para estabilizar os analitos mais voláteis, evitando a superestabilização dos refratários. A temperatura de pirólise deve ser baixa o suficiente para evitar perdas dos analitos voláteis e alta o suficiente para remover a maioria dos componentes da matriz sempre que possível. Já a temperatura de atomização deve ser alta para atomizar os elementos mais refratários, sem diminuir muito a intensidade do sinal para os mais voláteis. No entanto, quando os analitos possuem comportamentos térmicos muito diferentes, é preciso considerar a possibilidade de se optar pela determinação sequencial (RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013). A determinação simultânea



usando HR-CS GF AAS tem como vantagens um aumento na frequência analítica do método e um menor consumo do forno de grafite, porque um único programa de temperatura pode permitir a determinação de dois ou mais elementos. Em vista dessas vantagens, muitos métodos têm sido propostos envolvendo determinações simultâneas de metais usando HR-CS GF AAS (FERREIRA et al., 2018).

### 3.2.3.2 Determinação Sequencial

A determinação sequencial de elementos químicos usando HR-CS GF AAS requer cuidados durante a otimização das condições experimentais. Neste caso, as linhas atômicas não precisam estar próximas, e o programa de temperatura possui uma etapa de atomização e leitura para cada elemento. O fator crítico é garantir que não haja perdas significativas dos analitos refratários na primeira etapa de atomização, na qual são atomizados aqueles mais voláteis. Métodos que empregam concomitantemente a determinação sequencial e simultânea também foram propostos (FERREIRA et al., 2018).

Levando em consideração todos esses aspectos, é possível não só monitorar elementos simultaneamente, mas também de forma sequencial, a partir de uma mesma alíquota de amostra, usando as condições ótimas do forno e comprimentos de onda adequados para cada um deles.

Outro aspecto importante é a possibilidade de adaptar a sensibilidade em função dos *pixels* selecionados do detector. Normalmente, para melhor sensibilidade e menores limites de detecção, o uso dos *pixels* centrais é o preferido. À medida que massas analíticas mais altas são introduzidas no atomizador, em algum momento o sinal no centro da linha de absorção começará a crescer mais lentamente, perdendo a resposta linear e eventualmente tornando-se saturado. No entanto, o perfil da linha de absorção também se torna muito mais amplo, de tal modo que o uso de *pixels* laterais pode se tornar vantajoso, permitindo um aumento na faixa de trabalho. Esta estratégia torna-se ainda mais importante quando se tenta realizar determinações multielementares, porque é praticamente a única abordagem que permite adaptar a sensibilidade para um elemento sem afetar a sensibilidade para os outros. Além disso, é simples de aplicar, pois as informações de todos os 200 *pixels* do detector estão sempre disponíveis. O analista pode decidir quais são os mais adequados,

mesmo após a análise, sem a necessidade de realizar outra medida (RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013).

Dois artigos de revisão de Resano e colaboradores discorrem sobre as aplicações da HR-CS SS-GF AAS. O primeiro tem como objetivo servir de guia para desenvolvimento de métodos (RESANO; ARAMENDÍA; BELARRA, 2014) e o segundo explora novas possibilidades para a técnica (RESANO et al., 2019). Em ambos, foi feito um levantamento dos artigos que utilizam a técnica para a determinação de metais. Há trabalhos que determinam cádmio e ferro ou cádmio e níquel de modo sequencial, bem como ferro e níquel simultaneamente. Todavia, não há registro de determinação sequencial e simultânea dos três analitos. Também estão especificados os tipos de amostra que foram analisados e não há um trabalho que tenha determinado esses metais nas amostras escolhidas utilizando essa técnica. Sendo assim, o presente trabalho, presumivelmente, é inédito.

## 4 EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os frascos utilizados para armazenar as amostras, soluções padrão e de modificador, assim como toda a vidraria utilizada para o preparo de soluções foram lavados com água destilada, descontaminados em banho de ácido nítrico 10% (v/v), por tempo mínimo de 24 horas, e lavados com água ultrapura.

A água utilizada no preparo das soluções foi purificada por um sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, EUA), com resistividade de 18,2 m $\Omega$ .cm a 25 °C. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O ácido nítrico utilizado foi bidestilado em destilador de quartzo (Kurner Analysentechnik, Alemanha).

Foram utilizadas soluções padrão estoque monoelementares de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cd, Ni e Fe (SpecSol, São Paulo, Brasil) para preparar as soluções intermediárias e as soluções de trabalho multielementares, através de diluições adequadas em ácido nítrico 0,014 mol L<sup>-1</sup>. As mesmas foram armazenadas em frascos de polipropileno, sob refrigeração.

Como modificador químico, foi utilizada uma solução de 0,1% (m/v) Pd, 0,06% (m/v) Mg e 0,05% (m/v) Triton X-100. A solução foi preparada a partir de diluições adequadas de soluções de 10 g L<sup>-1</sup> Pd(NO<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, San Luis, EUA) e de 10 g L<sup>-1</sup> Mg (Fluka Analytical, Loughborough, Inglaterra). O material de referência certificado de folhas de tomate, NIST SRM 1573a (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, EUA), foi empregado para avaliar a exatidão do método.

### 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

O equipamento utilizado para realizar as medidas de absorvância foi um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo contrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha). O mesmo possui dois tipos de atomizadores, chama e forno de grafite com aquecimento transversal, sendo somente o último aplicado neste trabalho. Como já mencionado, este equipamento conta com uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade operando no modo hot-spot como fonte de radiação, um monocromador duplo de alta resolução e

um detector CCD. Para avaliar o cádmio, utilizou-se sua linha principal de 228,802 nm. O níquel foi avaliado na sua linha principal também (232,003 nm) e o ferro em 232,036 nm (1,4% de sensibilidade relativa). Todos os analitos tiveram os *pixels* central e dois adjacentes monitorados. Foram empregados fornos e plataformas para amostras sólidas, ambos de grafite e recobertos com grafite pirolítico (Analytik Jena) nos experimentos. A plataforma foi posicionada dentro do forno com o auxílio de um amostrador manual para sólidos (modelo SSA 5, Analytik Jena). O gás de purga utilizado foi argônio com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil).

Um micro moinho modelo A-11 Basic (IKA-Werke, Staufen, Alemanha) foi usado para a moagem das amostras. Para a pesagem das amostras, utilizou-se uma microbalança MSA6.6S-000-DM (Sartorius, Göttingen, Alemanha). Para realizar o teste de umidade, foi utilizado um liofilizador modelo ModulyoD-115 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA).

#### 4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Sementes de abóbora sem casca, crua e torrada, girassol sem casca, crua e torrada, chia, amaranto e quinoa foram adquiridas em mercados locais do Rio Grande do Sul. As mesmas foram moídas em um micromoinho. Cada amostra foi submetida à três ciclos de moagem, sendo cada ciclo caracterizado por 20 segundos de moagem seguidos de 30 segundos de intervalo, sendo este procedimento repetido três vezes para totalizar um ciclo. Após a moagem, as amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno vedados e previamente descontaminados. Para o estudo da influência do tamanho de partícula, as amostras de quinoa foram peneiradas em malhas de nylon com diversos tamanhos de abertura.

#### 4.4 PROCEDIMENTO DE MEDIDA

Adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de solução de modificador e 10  $\mu\text{L}$  de solução padrão ou branco na plataforma, com auxílio de micropipetas. A plataforma foi inserida dentro do forno de grafite com o auxílio do amostrador manual de amostras sólidas e o conjunto foi submetido ao programa de temperatura, demonstrado na Tabela 1. Foi registrado o sinal de absorvância integrada ( $A_{\text{int}}$ ), sendo monitorados os *pixels*

central e dois adjacentes para os três elementos, conforme citado no item 4.2. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

No caso das amostras sólidas, a plataforma foi colocada sobre uma microbalança e alíquotas entre 0,2 e 2,0 mg de amostra foram pesadas diretamente na plataforma, com o auxílio de uma espátula. A plataforma foi levada para o amostrador manual com o auxílio de uma pinça e 5  $\mu\text{L}$  de solução de modificador foram adicionados. Após isso, posicionou-se a plataforma dentro do forno de grafite e o conjunto foi submetido ao mesmo programa de temperatura citado anteriormente. Cada amostra foi analisada cinco vezes. Levando-se em consideração que as massas de amostra foram diferentes para cada replicata, as Aint obtidas foram normalizadas para uma mesma massa de amostra, tornando possível a comparação dos resultados.

Tabela 1 – Programa de aquecimento do forno de grafite.

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Rampa (<math>^{\circ}\text{C s}^{-1}</math>)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Gás (<math>\text{L min}^{-1}</math>)</b>
Secagem 1	90	3	20	2
Secagem 2	110	5	10	2
Pirólise	600	300	30	2
Atomização <b>Cd</b>	1500	3000*	10	0*
<b>Mudança de comprimento de onda</b>				
Atomização <b>Ni e Fe</b>	2500	3000	7	0
Limpeza	2600	1000	4	2

\* Para as amostras de semente de girassol, a rampa mudou para  $1500\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$  e utilizou-se um fluxo de gás de  $0,1\text{ L min}^{-1}$  durante a atomização.

Nas Figuras, quando não especificado, são apresentados os valores de Aint média para três replicatas de soluções padrão e cinco para amostras. As barras de erros correspondem aos desvios padrões das medidas. Para as amostras a Aint foi normalizada para 1,0 mg.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESCOLHA DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

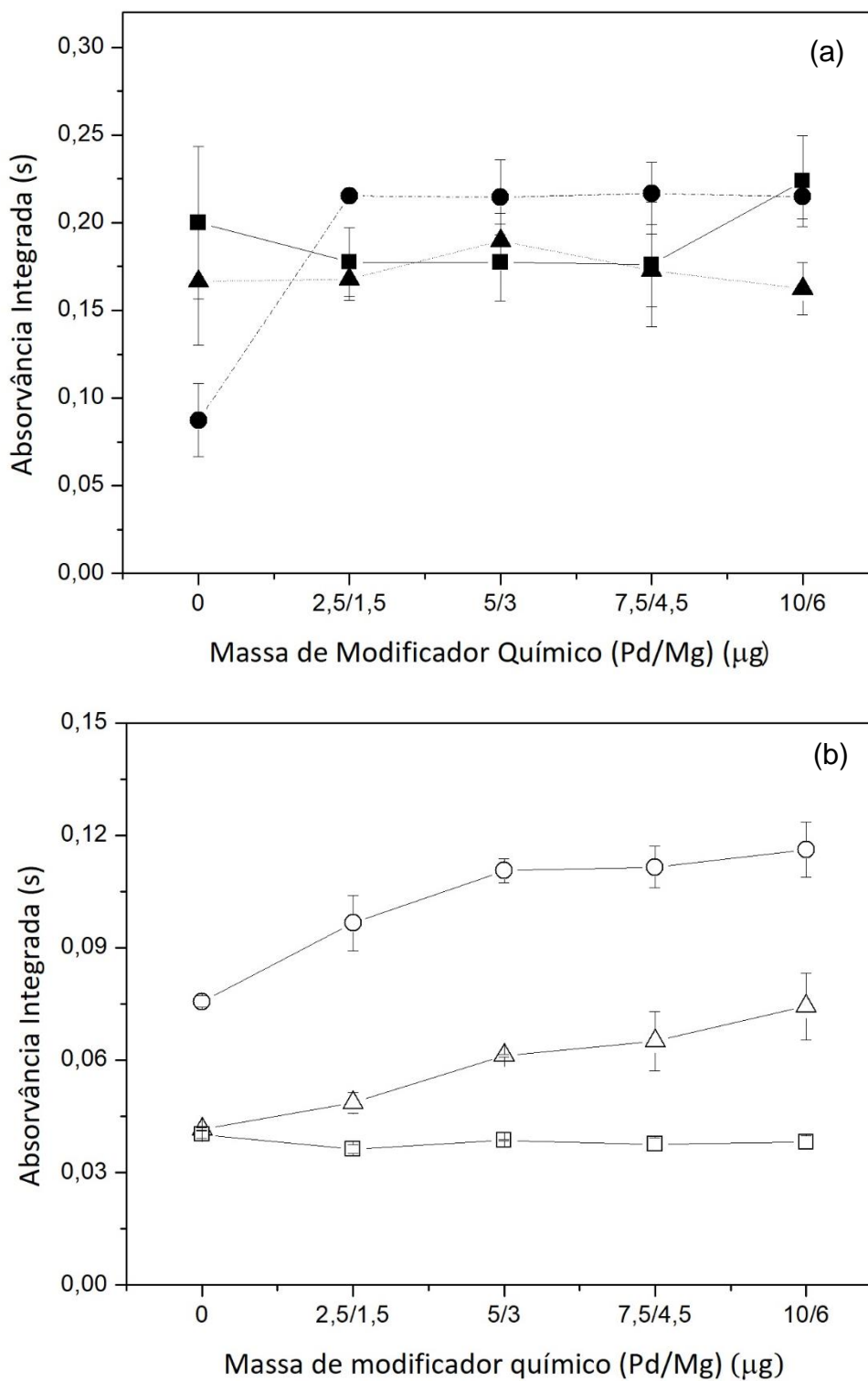
As linhas analíticas do ferro e do níquel, de 232,036 e 232,003 nm, respectivamente, são observadas na mesma janela espectral. Somado ao fato de possuírem comportamento térmico semelhante, o monitoramento simultâneo desses dois analitos se torna possível, como já foi reportado na literatura (POZZATTI et al., 2017). A principal linha analítica do cádmio é a de 228,802 nm, e seu comportamento térmico é bem distinto quando comparado ao níquel e ao ferro, sendo muito mais volátil. Assim, ao empregar um programa de temperatura apropriado, é possível determiná-lo antes, e em sequência realizar a determinação simultânea do ferro e do níquel.

### 5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROGRAMA DE TEMPERATURA

#### 5.2.1 Modificador Químico

A determinação de cádmio requer o uso de um modificador químico para estabilizá-lo termicamente. Assim, optou-se por investigar o uso de solução de Pd e Mg por ser considerada um modificador universal (SCHLEMMER; WELZ, 1986). Foi realizado um estudo de massa de modificador para o padrão e para a amostra de quinoa. Foram adicionados diferentes volumes de solução de modificador sobre os 10 µL de solução padrão aquosa multielementar e sobre alíquotas de semente de quinoa. Os resultados estão demonstrados na Figura 2.

Figura 2 – Estudo de massa de modificador para (a) amostra de quinoa: (●) Cd, (▲) Ni e (■) Fe; e (b) solução padrão: (○) 20 pg Cd, (△) 0,25 ng Ni e (□) 20 ng Fe.  $T_p = 600\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{aCd} = 1500\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{aNi e Fe} = 2500\text{ }^\circ\text{C}$ . A Aint da amostra foi normalizada para 1,0 mg.



Observou-se que o sinal obtido para o cádmio na amostra de quinoa (Figura 2a) aumentou quando o modificador foi empregado, como era o esperado. Já para o níquel e o ferro, o uso de modificador não teve influência significativa, considerando os desvios padrão. Sendo assim, 2,5 µg de Pd com 1,5 µg de Mg é o suficiente para estabilizar o cádmio na amostra. Para o padrão (Figura 2b), a quantidade de modificador necessária para estabilizar o cádmio é maior, 5 µg de Pd com 3 µg de Mg. A menor quantidade de modificador requerida na amostra é, possivelmente, devido ao fato da amostra ter algo em sua composição que estabilize o Cd. A Aint do níquel no padrão também aumentou com o aumento da massa de modificador, pois o modificador retarda a atomização do níquel, o que é observado através do aparecimento de uma cauda no sinal. Quanto maior a massa de modificador empregada, mais difícil é a atomização do níquel, o que implica em maior cauda e, conseqüentemente, num aumento de Aint. Assim, a massa de 5 µg de Pd com 3 µg de Mg, que é suficiente para estabilizar o cádmio no padrão, foi escolhida e empregada em todas as demais etapas do trabalho.

### 5.2.2 Pirólise

Num primeiro momento, otimizou-se as temperaturas de pirólise ( $T_p$ ) e de atomização ( $T_a$ ) para o cádmio por ele ser o mais volátil, sendo monitorados os sinais de Aint de níquel e ferro (que são atomizados posteriormente) para garantir que não haja perda dos mesmos. As curvas de pirólise para a solução padrão aquosa multielementar e para a amostra de quinoa estão demonstradas na Figura 3. Temperaturas entre 200 °C e 1000 °C foram investigadas, com intervalos de 200 °C, fixando a temperatura de atomização do cádmio em 1500 °C e para o níquel e o ferro em 2500 °C.

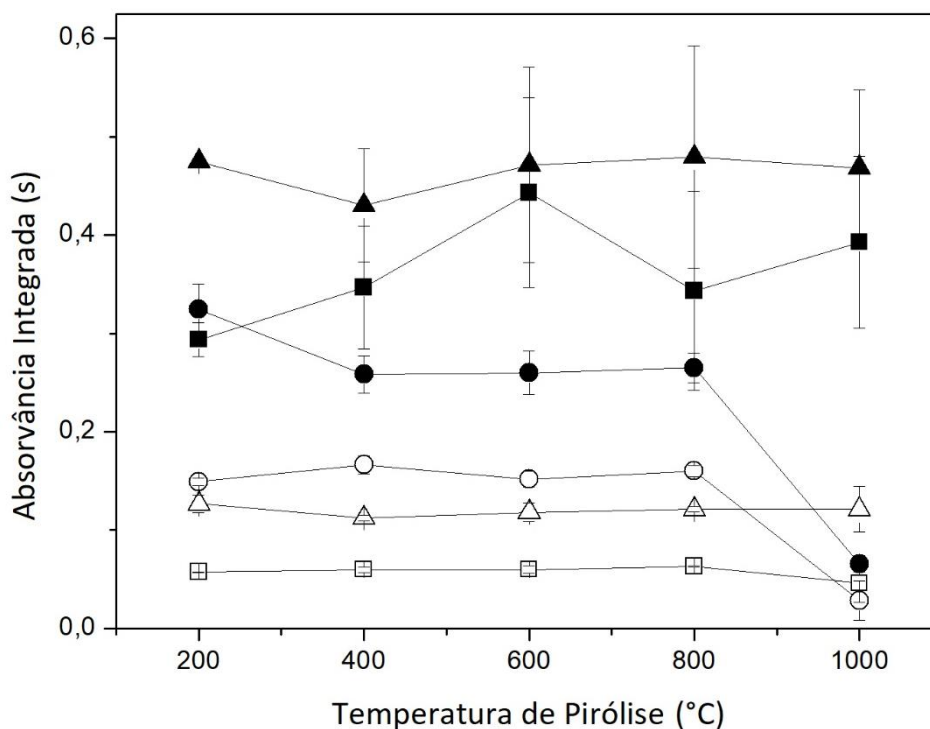
Para a solução padrão, é observado um platô até 800 °C para os três elementos. Ao aplicar a temperatura de 1000 °C, o sinal de cádmio reduz significativamente. A partir desta temperatura, se dá início à atomização do cádmio, que é expulso do forno devido ao fluxo de gás. Isso ocasiona a perda de cádmio nesta etapa. Conseqüentemente, se obtém menor sinal de Aint, pois esta é medida somente durante a etapa seguinte, de atomização.

Para a amostra, os picos observados a 200 e a 400 °C são ruidosos e observa-se a presença de fumaça devido à decomposição incompleta da matriz.



Não há diferença significativa ao comparar os sinais obtidos para 600 °C e 800 °C. Como era esperado, há perda de cádmio na temperatura de 1000 °C. Assim, a temperatura de pirólise de 600 °C se mostrou a melhor opção, sendo esta a utilizada nos demais experimentos. A temperatura de 800 °C também poderia ser empregada, no entanto, optou-se pela de 600 °C no intuito de prolongar a vida útil do tubo de grafite.

Figura 3 – Curvas de pirólise para amostra de quinoa (●) Cd, (▲) Ni e (■) Fe e solução padrão (○) 20 pg Cd, (△) 0,25 ng Ni e (□) 20 ng Fe.  $T_{Cd} = 1500$  °C e  $T_{Ni}$  e  $T_{Fe} = 2500$  °C. A  $A_{int}$  da amostra foi normalizada para 1,0 mg.

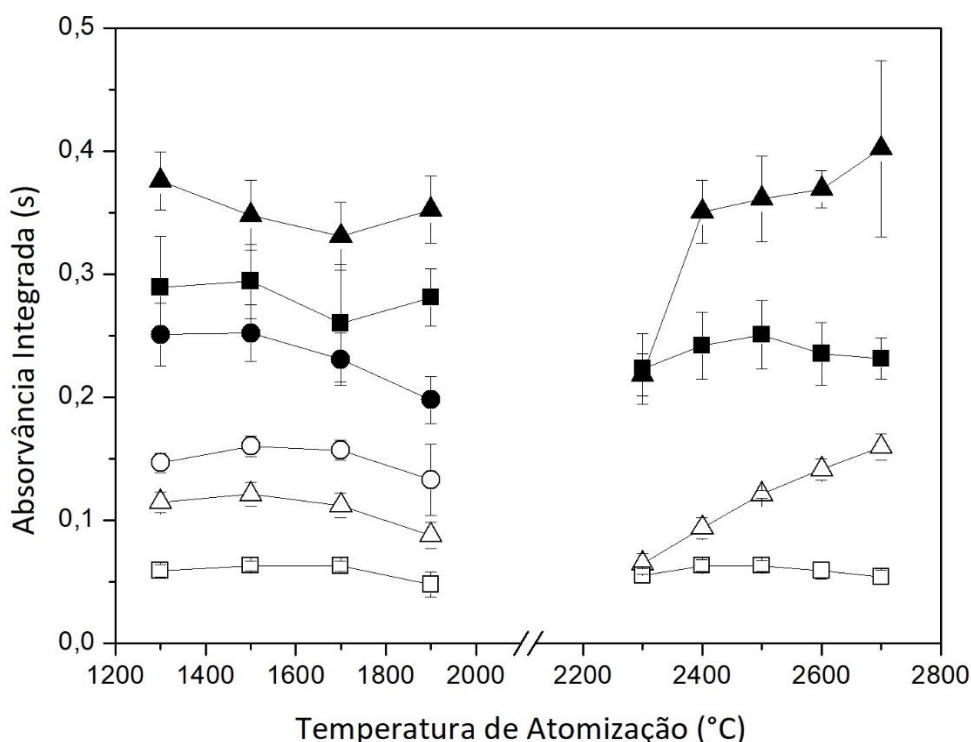


### 5.2.3 Atomização

Após a otimização da pirólise, otimizou-se a atomização do cádmio, fixando-se a temperatura de pirólise em 600 °C. Foram investigadas temperaturas entre 1300 °C e 1900 °C. As curvas de atomização estão demonstradas na Figura 3. Os valores de  $A_{int}$  para níquel e ferro na amostra e na solução padrão foram monitorados durante a atomização do cádmio para garantir que não há perda dos mesmos nessa etapa, uma vez que ela pode ser considerada como uma segunda etapa de pirólise para os outros dois.

Ao observar a curva de atomização do cádmio (Figura 4, lado esquerdo), observa-se uma redução de  $A_{int}$  tanto para a solução padrão quanto para a amostra quando aplicada temperatura superior a 1500 °C. Percebe-se também que não há perda de níquel e ferro durante esta etapa, sendo os sinais praticamente constantes ao se levar o desvio padrão em consideração, havendo um decréscimo mínimo a 1900 °C. Assim, definiu-se a temperatura de 1500 °C como condição ótima para atomização do cádmio.

Figura 4 – Curvas de atomização para amostra de quinoa (●) Cd, (▲) Ni e (■) Fe e solução padrão (○) 20 pg Cd, (△) 0,25 ng Ni e (□) 20 ng Fe.  $T_p = 600$  °C. Curvas do lado direito:  $T_{aCd} = 1500$  °C. Curvas do lado esquerdo:  $T_{aNi}$  e  $T_{aFe} = 2500$  °C.



Após a otimização das temperaturas de pirólise e atomização para o cádmio, a etapa de atomização do níquel e do ferro foi otimizada. Foram avaliadas temperaturas entre 2300 °C e 2700 °C (Figura 4, lado direito). Os valores de  $A_{int}$  para ambos os elementos na amostra foram praticamente constantes entre 2400 °C e 2700 °C. Para a solução padrão, os analitos apresentaram comportamentos opostos. O sinal de Fe decaiu levemente com o aumento da temperatura, enquanto o sinal de Ni aumenta. O aumento de sinal para o Ni para temperaturas mais elevadas pode ser explicado pela presença de cauda no sinal. Para temperaturas mais baixas,

a cauda é mais pronunciada, o que indica uma atomização incompleta. Considerando o fato de que a cauda se manteve presente mesmo à temperatura de 2700 °C, definiu-se 2500 °C como temperatura ótima de atomização, visando estender a vida útil dos fornos de grafite.

### 5.3 TEOR DE UMIDADE

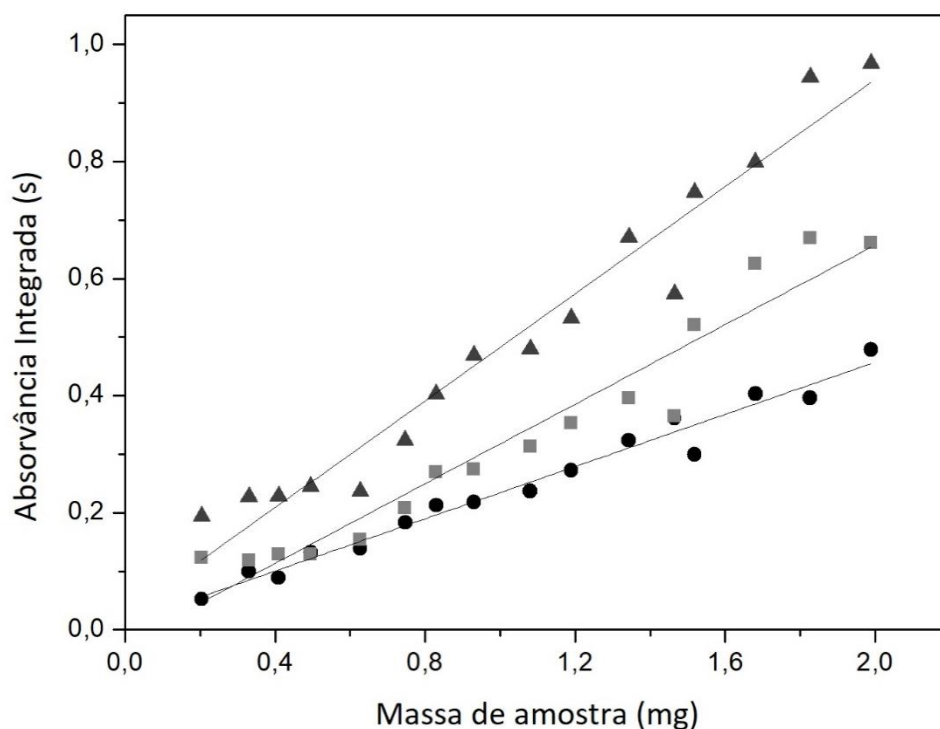
Em vista de tornar o procedimento de preparo de amostra o mais simples possível, foi realizado um estudo para determinar a umidade nas sementes e avaliar se a etapa de secagem seria necessária. O teste foi realizado com sementes de chia, que foram escolhidas devido à sua característica peculiar de absorver a água quando submersas. Duas alíquotas de amostra foram submetidas à secagem em liofilizador. Optou-se por realizar o procedimento em liofilizador ao invés de estufa, para evitar perda dos analitos por volatilização. Uma das alíquotas foi retirada do liofilizador cinco vezes em intervalos de tempo de uma hora para ser pesada e ter sua perda de umidade avaliada, enquanto a outra foi mantida no liofilizador durante todo o processo, servindo de controle. Após cinco horas, ambas as alíquotas apresentaram variação de massa inferior a 1%. Logo, concluiu-se que o procedimento de secagem das amostras era desnecessário. Esse resultado era esperado visto que as sementes apresentam pouca percentagem de água na sua composição.

### 5.4 ESTUDO DE MASSA DE AMOSTRA

Como já comentado, a análise direta de sólidos possui algumas dificuldades relacionadas à homogeneidade da amostra, erros devido ao uso de diferentes massas, tamanho de amostra limitado e, como consequência desses fatores, altos desvios padrões relativos. Sendo assim, para avaliar a influência da massa de amostra introduzida no forno de grafite, sob as condições otimizadas, foi avaliada a relação entre diferentes massas da amostra de quinoa e os respectivos sinais de Aint para Cd, Ni e Fe. Foram pesadas massas entre 0,2 e 2,0 mg e obtiveram-se os coeficientes de correlação para os três analitos. Não foram investigados valores de massa maiores devido ao alto sinal de Aint para Ni e Fe. Os resultados estão demonstrados na Figura 5 e indicam que massas de amostra dentro do intervalo

estudado não influenciam a resposta analítica, sendo os três coeficientes de regressão maiores que 0,90.

Figura 5 – Curvas de massa de amostra para os três analitos: Cd (●)  $R = 0,97$ ; Ni (▲)  $R = 0,95$ ; e Fe (■)  $R = 0,93$ .  $T_p = 600\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_{aCd} = 1500\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{aNi e Fe} = 2500\text{ }^\circ\text{C}$ . Cada ponto representa o valor de  $A_{int}$  de uma medida.



## 5.5 HOMOGENEIDADE

Na análise direta de sólidos, a precisão dos resultados pode ser influenciada pelo tamanho de partícula das amostras. Como as massas de amostra muitas vezes são menores que 1 mg, há uma preocupação relacionada à representatividade dessas alíquotas. Por isso, foi avaliada a influência do tamanho de partícula no sinal analítico e RSD. Uma alíquota da amostra de semente de quinoa foi moída e peneirada de forma a obter-se cinco grupos de diferentes granulometrias. Para fins comparativos, analisou-se também a quinoa moída sem peneirar, não havendo assim um controle de tamanho de partícula. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Estudo da influência do tamanho de partícula no sinal de Aint normalizado para 1,0 mg da amostra de quinoa. Média e desvio padrão relativo para número de replicatas n=6.

Tamanho de partícula (µm)	Média de Aint Normalizada (s) ± RSD		
	Cd	Ni	Fe
<b>Sem controle</b>	0,2967 ± 3%	0,5429 ± 13%	0,3843 ± 17%
≤250	0,2904 ± 7%	0,8170 ± 16%	0,3357 ± 10%
≤180	0,3110 ± 5%	0,8326 ± 4%	0,4604 ± 7%
≤150	0,2983 ± 6%	0,9871 ± 11%	0,4859 ± 4%
≤77	0,3032 ± 6%	0,7735 ± 4%	0,4192 ± 3%
≤45	0,2703 ± 4%	0,8661 ± 7%	0,4371 ± 4%

Observa-se que a influência do tamanho de partícula é mais significativa para Ni e Fe, e que a distribuição de Cd não é afetada. Pode-se concluir que o tamanho de partícula de 180 µm já é o suficiente para garantir uma precisão, estando os desvios padrão relativos abaixo ou próximos de 10%, o que é considerado adequado para esta técnica.

A otimização do método até o momento foi realizada utilizando sementes de quinoa como amostra, e a partir do estudo de tamanho de partícula pode-se concluir que seria mais adequado trabalhar com amostras cujo tamanho de partícula não ultrapassasse 180 µm. Todavia, não se obteve um resultado satisfatório ao tentar aplicar esta condição em outras amostras. As sementes de abóbora, chia e girassol apresentam características distintas dos pseudocereais. Possuem entre 30% (chia) e 50% (abóbora e girassol) de óleo em sua composição, e ao moê-las, o óleo liberado provocou aglutinação das partículas, o que impediu uma peneiração bem sucedida dessas amostras. Assim, optou-se por uma nova abordagem para contornar a problemática de homogeneidade das amostras.

Sementes de girassol torradas foram moídas conforme o procedimento descrito na seção 4.3 e submetidas a um estudo de homogeneidade. O estudo foi feito através da determinação dos três analitos em diferentes massas de amostra. Foram avaliadas três faixas de massa: 0,20 – 0,50 mg; >0,50 – 0,80 mg; e >0,80 – 1,1 mg. Foi necessário realizar algumas modificações no programa de temperatura devido ao alto teor de cádmio encontrado, pois extrapolava a linearidade do método mesmo ao alterar o número de *pixels* para avaliação do sinal. Sendo assim, o

cádmio foi determinado utilizando fluxo de gás mínimo na sua etapa de atomização e a rampa passou de 3000 para 1500°C s<sup>-1</sup> para retardar o início da atomização e assegurar que isso só ocorra após o início da leitura. Para cada intervalo de massa, foram feitas dez determinações. Os resultados estão demonstrados na Tabela 3. Os valores de He encontrados foram menores que 10 mg<sup>1/2</sup> para os três analitos nas três faixas de massa avaliadas, indicando que todas as faixas são homogêneas.

Tabela 3 – Valores de He (mg<sup>1/2</sup>) e RSD obtidos para a determinação de cada um dos três analitos em sementes de girassol torradas em três faixas de massa distintas, sendo n=10 para cada intervalo.

Analito	0,20 - 0,50 mg		>0,50 - 0,80 mg		>0,80 - 1,1 mg	
	He	RSD	He	RSD	He	RSD
<b>Cd</b>	9,9	17	8,3	11	9,3	8,8
<b>Ni</b>	7,5	12	9,8	8,2	6,8	10
<b>Fe</b>	7,3	12	8,3	9,4	7,8	8,7

## 5.6 PARÂMETROS DE MÉRITO

Os parâmetros de mérito para a determinação de Cd, Ni e Fe estão resumidos na Tabela 4 e foram obtidos através de curvas de calibração com soluções padrão aquosas multielementares. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados como três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez medidas de branco, dividido pela inclinação da curva de calibração. As medidas de branco foram realizadas de acordo com a técnica de resposta zero de massa (NOMURA; DA SILVA; OLIVEIRA, 2008), introduzindo a plataforma vazia no forno de grafite repetidamente, e aplicando o programa de temperatura completo descrito na Tabela 1. Os valores de LOD, LOQ e massa característica ( $m_0$ ) encontrados estão concordantes ou inferiores aos reportados na literatura para o Cd (DE ANDRADE et al., 2013), Ni e Fe (POZZATTI et al., 2017)

Tabela 4 – Parâmetros de mérito para a determinação de Cd, Ni e Fe em sementes por HR-CS SS GF AAS. LOD e LOQ foram calculados para o máximo de amostra utilizado (2 mg).

	<b>Cd</b>	<b>Ni</b>	<b>Fe</b>
<b>Curva de Calibração</b>	10 – 80 pg	0,12 – 4,0 ng	10 – 40 ng
<b>Coef. de Correlação</b>	0,999	0,997	0,992
<b>m<sub>0</sub> (pg)</b>	0,47	9,5	612
<b>LOD (µg kg<sup>-1</sup>)</b>	0,41	14	74
<b>LOQ (µg kg<sup>-1</sup>)</b>	1,4	48	248

### 5.6.1 Análise de Material de Referência Certificado

A exatidão do método foi avaliada ao analisar o material de referência certificado. Foi aplicado o mesmo procedimento utilizado nas amostras, exceto pela quantidade de massa inserida no forno. Essa diferença se deve à alta concentração de cádmio no material, sendo necessário pesar massas em torno de 0,05 mg para quantificá-lo. Para evitar comprometer a determinação simultânea de níquel e ferro devido à diminuição da quantidade de massa avaliada e visando não exceder o limite linear das curvas de calibração, os valores de  $A_{int}$  para o Cd foram obtidos utilizando somente o *pixel* central, e, por isso, foi construída uma curva de calibração para o *pixel* central, através do reprocessamento dos dados da curva original.

Os resultados foram comparados com os valores certificados através do teste estatístico *t-Student*, e estão descritos na Tabela 5. Como os valores de  $t_{calculados}$  foram todos inferiores ao  $t_{crítico}$ , pode-se afirmar que as concentrações de cádmio, níquel e ferro encontradas no CRM são estatisticamente iguais aos valores certificados, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 5 - Determinação de cádmio, níquel e ferro, em  $\text{mg kg}^{-1}$  (concentração  $\pm$  desvio padrão) no CRM NIST SRM 1573a e os valores de  $t_{\text{calculado}}$  para o teste t-Student (nível de confiança de 95%:  $t_{\text{crítico}} = 2,57$ ), sendo  $n=5$ .

	<b>Valor Certificado</b>	<b>Encontrado</b>	<b><math>t_{\text{calculado}}</math></b>
<b>Cd</b>	1,52 $\pm$ 0,04	1,53 $\pm$ 0,07	0,16
<b>Ni</b>	1,59 $\pm$ 0,07	1,72 $\pm$ 0,17	1,72
<b>Fe</b>	368 $\pm$ 7	358 $\pm$ 30	0,90

## 5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

Aplicou-se o método desenvolvido para quantificar os metais Cd, Ni e Fe nas amostras de sementes de abóbora sem casca cruas e torradas, girassol sem casca cruas e torradas, chia, amaranto e quinoa. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6. A determinação nas sementes de quinoa e amaranto foram feitas com o tamanho de partícula controlado ( $<180 \mu\text{m}$ ). Já as sementes de chia, girassol e abóbora foram somente moídas, sem controle de tamanho de partícula, sendo pesadas massas maiores que 0,2 mg para assegurar a homogeneidade das mesmas. As sementes de girassol foram submetidas a um programa de temperatura modificado, conforme informa a Tabela 1, e para a determinação de cádmio, utilizou-se uma nova curva de calibração feita sob as mesmas condições.



Tabela 6 – Concentrações de cádmio, níquel e ferro em amostras de sementes seguidas de desvio padrão (concentração  $\pm$  desvio padrão), bem como RSD (n=5).

Semente	Cd		Ni		Fe	
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	RSD (%)	$\text{mg kg}^{-1}$	RSD (%)	$\text{mg kg}^{-1}$	RSD (%)
<b>Amaranto</b>	$12 \pm 1$	9	$0,63 \pm 0,04$	7	$141 \pm 9$	7
<b>Quinoa</b>	$38 \pm 2$	6	$1,3 \pm 0,1$	6	$55 \pm 5$	8
<b>Chia</b>	$2,7 \pm 0,2$	6	$1,8 \pm 0,2$	10	$75 \pm 4$	6
<b>Girassol Crua</b>	$108 \pm 21$	19	$2,7 \pm 0,4$	13	$40 \pm 3$	7
<b>Girassol Torrada</b>	$127 \pm 20$	16	$3,3 \pm 0,3$	8	$43 \pm 3$	7

As amostras de amaranto, chia, girassol e quinoa puderam ser analisadas sem maiores dificuldades, sendo que as concentrações dos três metais em todas essas amostras ficaram acima do LOQ. Já as amostras de sementes de abóbora, tanto crua quanto torrada, não puderam ser quantificadas, pois para os três elementos observou-se a presença de uma molécula que se sobrepõe espacial e temporalmente as linhas analíticas dos três elementos. Tentou-se corrigir essa interferência utilizando as ferramentas disponíveis no *software* do equipamento, no entanto, não se obteve sucesso.

Ao analisar os valores de RSD expostos na Tabela 5, observa-se que somente para as amostras mais oleosas, cuja composição é em torno de 50% óleo, obteve-se RSD maiores que 10%. Como se obteve valores de RSD abaixo de 20% para todas as amostras, tendo em vista a complexidade das amostras e o nível de concentração dos analitos nas mesmas, pode-se afirmar que o método apresenta precisão satisfatória (HUBER, 1998).

Pode-se destacar que a concentração de ferro na amostra de sementes de amaranto é significativamente maior que nas demais amostras. Também pode ser considerado um ponto de atenção a concentração de cádmio nas sementes de girassol, que extrapola o limite de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  estabelecidos pela ANVISA para cereais (ANVISA, 2013).

## 6 CONCLUSÕES

Considerando a necessidade de se ter métodos analíticos confiáveis para a determinação elementar em alimentos, o método proposto, empregando a HR-CS SS-GF AAS, pode ser considerado viável e atrativo para a determinação de Cd, Ni e Fe em sementes pois requer um mínimo preparo das amostras e dispensa o emprego de reagentes perigosos ou corrosivos. O LOQ do cádmio é menor que o limite de 0,10 mg kg<sup>-1</sup> estabelecido na legislação para cereais, o que reforça o potencial do método para ser aplicado em análises de rotina de controle de qualidade.

A determinação simultânea e sequencial de Cd, Fe e Ni em amostras de sementes é possível devido as concentrações de Fe nas amostras serem pelo menos 10 vezes maior que as do Ni, o que permite o emprego de uma linha de Fe de menor sensibilidade e não compromete a sua determinação.

O método é preciso e exato visto que se obteve valores de RSD abaixo de 20% para todas as amostras e que os valores encontrados para o CRM foram concordantes com os certificados.

Mais estudos devem ser realizados para elucidar as interferências espectrais encontradas nas amostras de sementes de abóbora. Como etapas futuras, pode-se citar a necessidade de serem feitas curvas de pirólise e atomização para amostras oleosas; a investigação da interferência espectral na amostra de abóbora; e estudos de homogeneidade para amostras de chia e abóbora.

## 7 REFERÊNCIAS

ALVAREZ-JUBETE, L.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. **Food Science & Technology**, v. 21, p. 106–113, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 42, de 29 de Agosto de 2013, p. 17, 2013.

BELTON, P. S.; TAYLOR, J. R. N. **Pseudocereals and Less Common Cereals: Grain Proprieties and Utilization Potential**. 1. ed. Nova Iorque: Springer, 2002.

BOLAÑOS, D.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, J. M. Elemental analysis of Amaranth, Chia, Sesame, Linen, and Quinoa seeds by ICP-OES: Assessment of classification by chemometrics. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 2, p. 477–484, 2016.

BORGES, D. L. G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 1, n. 18, p. 58–67, 2005.

COMAI, S. et al. Content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1350–1355, 2007.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007.

DE ANDRADE, J. B. et al. Sequential determination of Cd and Cr in biomass samples and their ashes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Talanta**, v. 115, p. 55–60, 2013.

DUARTE CORREA, A.; JOKL, L.; CARLSSON, R. Chemical constituents, in vitro protein digestibility, and presence of antinutritional substances in amaranth grains. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 36, p. 319–326, 1986.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. 1. ed. São

Paulo: SARVIER, 1998.

EBRAHIMIAN, E. et al. Seed yield and oil quality of sunflower, safflower, and sesame under different levels of irrigation water availability. **Agricultural Water Management**, v. 218, p. 149–157, 2019.

FAO; OMS. **Human Vitamin and Mineral Requirements**, 2. ed., Roma: FAO, 2001.

FERREIRA, S. L. C. et al. Atomic absorption spectrometry – A multi element technique. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 1–6, 2018.

HEITMANN, U. et al. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p. 1095–1105, 1996.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. **LC GC Europe**, v. 11, n. 2, p. 96–105, 1998.

KURFÜRST, U. et al. Micro-heterogeneity of trace elements in reference materials — determination and statistical evaluation. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 345, n. 2–4, p. 112–120, 1993.

MERU, G. et al. Phenotypic relationships among oil, protein, fatty acid composition and seed size traits in *Cucurbita pepo*. **Scientia Horticulturae**, v. 233, n. February, p. 47–53, 2018.

MUÑOZ, L. A. et al. Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. **Food Reviews International**, v. 29, n. 4, p. 394–408, 2013.

NASCIMENTO, A. C. et al. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. **Food Chemistry**, v. 148, p. 420–426, 2014.

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

ONU, Brasil. **FAO elege 2013 como Ano Internacional da Quinoa**. 2012. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/fao-elege-2013-como-ano-internacional-da-quinoa/>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos Traço na Nutrição e Saúde Humanas**. 1. ed. São Paulo: ROCA, 1998.

PAUWELS, J.; HOFMANN, C.; VANDECASTEELE, C. On the usefulness of SS-ZAAS for the microhomogeneity control of CRM's. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 348, n. 7, p. 418–421, 1994.

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

RESANO, M. et al. Quo vadis high-resolution continuum source atomic/molecular absorption spectrometry? **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 1, p. 59–80, 2019.

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

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

RUBIO, C. et al. Metals in food products with rising consumption (brewer's yeast, wheat bran, oat bran, sesame seeds, flaxseeds, chia seed). A nutritional and toxicological evaluation. **Journal of Functional Foods**, v. 48, n. August, p. 558–565, 2018.

SCHLEMMER, G.; WELZ, B. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta**

**Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 41, n. 11, p. 1157–1165, 1986.

SKOOG; HOLLER; NIEMAN. **Principios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SLAVIN, W.; MANNING, D. C.; CARNRICK, G. R. The stabilized temperature platform furnace. **Atomic Spectroscopy**, v. 2, p. 137, 1981.

VERSANTO, M.; WINSTON, C.; SUSAN, L. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. **Journal of The Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 116, n. 12, p. 1970–1980, 2016.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; HEITMANN, U. **High Resolution Continuum Source AAS – The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

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