

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

DÉBORA NUNES BAZANELLA

**NOVA ESTRATÉGIA ANALÍTICA PARA VERIFICAR A CONFORMIDADE DE  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES QUANTO AOS RECENTES LIMITES DE  
CROMO E FERRO ESTABELECIDOS PELA AGÊNCIA NACIONAL DE  
VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

DÉBORA NUNES BAZANELLA

**NOVA ESTRATÉGIA ANALÍTICA PARA VERIFICAR A CONFORMIDADE DE  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES QUANTO AOS RECENTES LIMITES DE  
CROMO E FERRO ESTABELECIDOS PELA AGÊNCIA NACIONAL DE  
VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

Trabalho de conclusão apresentado junto à  
atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do  
Curso de Química Industrial, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Química  
Industrial

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Morgana Bazzan Dessuy  
Orientadora

Dr. Eng. Wiliam Boschetti  
Coorientador

Porto Alegre

2018

Dedico este trabalho aos meus pais.  
Muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Rosele e Hamilton Bazanella, por todo o apoio, compreensão e carinho, fundamentais para a conclusão de mais essa etapa da minha vida.

À minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup>. Morgana Dessuy e ao meu coorientador Dr. Eng. Wiliam Boschetti pela paciência, disponibilidade e comprometimento com o presente trabalho, e por dividirem comigo seus conhecimentos.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Goreti R. Vale e a Professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Messias, por disponibilizarem o laboratório e os materiais necessários para que fosse possível a realização deste trabalho.

À Thais Dewitte pela sua imprescindível ajuda e a todos os demais colegas do Laboratório de Análise de Traços da UFRGS por me receberem novamente, contribuir com seus ensinamentos e tornar o desenvolvimento deste trabalho mais leve.

Aos colegas da Souza Cruz que fizeram parte desse momento, pelo incentivo, paciência e conselhos nos momentos mais críticos.

Aos amigos por compreenderem os momentos de ausência.

## RESUMO

Considerando o crescente consumo de suplementos alimentares e os recentes limites de nutrientes estabelecidos pela ANVISA, é importante verificar a conformidade destes produtos quanto aos níveis de cromo e ferro. Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico simples e rápido para a determinação simultânea de cromo e ferro em suplementos alimentares por análise direta de amostras sólidas, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS), visando minimizar o preparo de amostras. Foram otimizados parâmetros como a massa de modificador e de amostra a ser utilizada, temperaturas de pirólise e atomização. Soluções padrão aquosas foram utilizadas para calibração. As massas características obtidas para cromo e ferro foram de 7,1 pg e 0,9 ng, respectivamente, e os limites de detecção de 1,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 0,06  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente. Esses limites são adequados em relação a quantidade mínima de cromo e ferro estabelecida pela ANVISA em suplementos alimentares, portanto o método pode ser aplicado. Quatro amostras de suplemento alimentar foram analisadas e uma apresentou nível de cromo acima do valor permitido. Os resultados comprovam que é possível determinar cromo e ferro simultaneamente por HR-CS GF AAS, com análise direta de amostras sólidas, de forma confiável e relativamente fácil quando comparada a outras técnicas que requerem mais recursos e tempo de análise.

Palavras-chave: cromo, ferro, suplemento alimentar, espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite, análise direta de amostras sólidas.

## ABSTRACT

Considering the increasing consumption of dietary supplements and the recent nutrient limits established by ANVISA, it is important to verify product compliance regarding chromium and iron levels. In this work, a simple and fast analytical method was developed for simultaneous determination of chromium and iron in dietary supplements with direct analysis of solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS), in order to minimize sample preparation. Parameters such as the modifier mass and sample mass to be used, pyrolysis and atomization temperatures were optimized. Aqueous standard solutions were used for calibration. The characteristic mass for chromium and iron were 7.1 pg and 0.9 ng, respectively, and the limits of detection of 1.7  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and 0.06  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively. These limits are adequate considering the minimum amount established by ANVISA for chromium and iron in dietary supplements, therefore the method can be applied. Four dietary supplement samples were analyzed and one sample presented chromium level above the allowed value. The results confirm that it is possible to determine chromium and iron simultaneously by HR-CS GF AAS, with direct analysis of solid samples, in a reliable and easy way when compared to other techniques that require more resources and analysis time.

Keywords: chromium, iron, dietary supplement, high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, direct analysis of solid samples.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Influência do preparo de amostra no tempo de uma análise.....	22
Figura 2 – Esquema de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, onde: (1) lâmpada de arco curto de Xe, (2) espelhos elipsoidais focalizadores, (3) atomizador (chama ou forno de grafite), (4) fenda de entrada, (5) espelhos parabólicos, (6) prisma, (7) fenda intermediária ajustável, (8) rede <i>echelle</i> e (9) detector CCD. ....	25
Figura 3 – Espectros de absorvância resolvidos temporalmente na vizinhança da linha analítica de cromo e ferro da amostra B. Tp: 1300 °C; Ta: 2600 °C.....	35
Figura 4 – Influência da massa de modificador para: amostra de suplemento alimentar B, absorvância normalizada para 1 mg, cromo (■) e ferro (■); 10 µL de soluções padrão aquosa com 0,5 ng de cromo (○) e 100 ng de ferro (○). Tp: 1300 °C; Ta: 2600 °C. ....	37
Figura 5 – Influência da massa de amostra de suplemento alimentar B no sinal analítico de cromo (■) e ferro (■). Tp: 1300 °C; Ta: 2600 °C; modificador químico: 25 µg de NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . ....	38
Figura 6 – Curvas de pirólise para: amostra de suplemento alimentar B, absorvância normalizada para 1 mg, cromo (■) e ferro (■); 10 µL de soluções padrão aquosa com 0,5 ng de cromo (○) e 100 ng de ferro (○). Ta: 2600 °C. ....	39
Figura 7 – Curvas de atomização para: amostra de suplemento alimentar B, absorvância normalizada para 1 mg, cromo (■) e ferro (■); 10 µL de soluções padrão aquosa com 0,5 ng de cromo (○) e 100 ng de ferro (○). Tp: 1300 °C.....	40
Figura 8 – Espectros de absorvância resolvidos temporalmente na vizinhança da linha analítica de cromo e ferro da amostra B: (a) 1,024 mg de amostra B, A <sub>int</sub> cromo: 0,15482 s, A <sub>int</sub> ferro: 0,28302 s, Ta: 2400 °C; (b) 1,233 mg de amostra B, A <sub>int</sub> cromo: 0,15234 s, A <sub>int</sub> ferro: 0,32737 s, Ta: 2600 °C.....	40
Figura 9 – Curvas de calibração para os padrões aquosos de cromo (a) e ferro (b). Tp: 1300 °C, Ta: 2600 °C. ....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites de consumo diário de cromo e ferro estabelecidos pela ANVISA de acordo com a faixa etária. ....	17
Tabela 2 – Métodos espectrométricos que utilizaram decomposição ácida como procedimento de preparo de amostra para a determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares. ....	20
Tabela 3 – Métodos espectrométricos que utilizaram suspensão como procedimento de preparo de amostra para a determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares.....	21
Tabela 4 – Métodos espectrométricos que utilizaram análise direta de amostras sólidas para a determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares.....	22
Tabela 5 – Amostras e suas respectivas características.....	31
Tabela 6 – Programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação simultânea de cromo e ferro <i>via</i> HR-CS GF AAS utilizando a análise direta de amostras sólidas. ....	32
Tabela 7 – Parâmetros obtidos para a determinação simultânea de cromo e ferro e amostras de suplemento alimentar. ....	42
Tabela 8 – Avaliação da exatidão do método proposto através da análise do SRM de ovo em pó. n: 6.....	43
Tabela 9 – Quantificação de cromo e ferro nas amostras de suplemento alimentar <i>via</i> HR-CS GF AAS.....	43
Tabela 10 – Comparação qualitativa entre as etapas do preparo de amostra, considerando o emprego ou não de procedimentos complexos de preparo de amostra. ....	46
Tabela 11 – Comparação qualitativa entre o uso de reagentes e equipamentos durante o preparo e análise das amostras, considerando o emprego ou não de procedimentos complexos de preparo de amostra.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês: <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> )
ABIAD	Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres
$A_{int}$	Absorvância integrada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma capacitivamente acoplado (do inglês: <i>Capacitively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> )
CRM	Material de referência certificado (do inglês: <i>Certified Reference Material</i> )
CV AAS	Espectrometria de absorção atômica com vapor frio (do inglês: <i>Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry</i> )
CV AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (do inglês: <i>Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry</i> )
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês: <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> )
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês: <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> )
HCL	Lâmpada de cátodo oco (do inglês: <i>Hollow Cathode Lamp</i> )
HG-AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês: <i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i> )
HPLC-ICP-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês: <i>High-performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
HR-CS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (do inglês: <i>High-resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> )

HR-ICP-MS	Espectrometria de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado (do inglês: <i>High-resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
IC	Intervalo de confiança
ICP	Plasma indutivamente acoplado (do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma</i> )
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> )
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
LA-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com ablação a laser (do inglês: <i>Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
LOD	Limite de detecção (do inglês: <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do inglês: <i>Limit of Quantification</i> )
LS AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês: <i>Line Source Atomic Absorption Spectrometry</i> )
$m_o$	Massa característica
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês: <i>National Institute of Standards and Technology</i> )
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês: <i>Relative Standard Deviation</i> )
SRM	Material de referência padrão (do inglês: <i>Standard Reference Material</i> )
Ta	Temperatura de atomização
TDA-AAS	Decomposição térmica, amalgamação e espectrometria de absorção atômica (do inglês: <i>Thermal decomposition, Amalgamation and Atomic Absorption Spectrometry</i> )
Tp	Temperatura de pirólise

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	14
2.1	Geral	14
2.2	Específicos	14
<b>3</b>	<b>PROPOSTA TECNOLÓGICA</b>	15
<b>4</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
4.1	Suplementos alimentares	16
4.2	Regulamentação	16
4.3	Cromo e ferro	18
4.4	Métodos para a determinação de elementos em suplementos	18
4.5	Forno de grafite e análise direta de sólidos	23
4.6	Princípio da espectrometria de absorção atômica	24
4.7	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua	25
4.8	Parâmetros de desempenho do método	28
4.8.1	Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade	28
4.8.2	Limites de detecção e quantificação	29
4.8.3	Precisão e exatidão	29
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	30
5.1	Materiais e reagentes	30
5.2	Amostras e preparo de amostras	30
5.3	Instrumentação	31
5.4	Linearidade e faixa de trabalho	32
5.5	Massa característica	33
5.6	Limites de detecção e quantificação	33
5.7	Precisão e exatidão	33
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	35
6.1	Escolha do comprimento de onda	35
6.2	Estudo do uso de modificador químico	35
6.3	Estudo da influência da massa de amostra	37

6.4	Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite.....	38
6.5	Parâmetros de desempenho do método .....	41
6.5.1	Curva de calibração, LOD, LOQ e m <sub>o</sub> .....	41
6.5.2	Precisão e exatidão .....	42
6.6	Determinação de cromo e ferro em suplementos alimentares .....	43
<b>7</b>	<b>AVALIAÇÃO ECONÔMICA.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>IMPACTO AMBIENTAL .....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de suplementos alimentares, como vitaminas, minerais e proteínas se popularizou nos últimos anos, principalmente pelo benefício de complementar a alimentação a um baixo custo e fácil acesso. No entanto, nem sempre o consumidor é capaz de julgar a qualidade, eficácia e segurança do produto.

Recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou as novas regras para estes produtos, com a finalidade de reduzir as lacunas regulatórias e a assimetria de informações em relação aos benefícios e riscos dos suplementos alimentares, estabelecendo as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem para estes produtos. Na Instrução Normativa N° 28, de 26 de julho de 2018, são apresentados os limites mínimos e máximos de nutrientes que devem estar presentes nos suplementos alimentares, de acordo com a recomendação diária de consumo por grupo populacional indicado pelo fabricante.

Tendo em vista o elevado consumo destes produtos e o recente surgimento de legislações, há uma eminente demanda tecnológica, tanto por parte das indústrias quanto dos órgãos fiscalizadores, por métodos analíticos capazes de avaliar a conformidade destes produtos em relação aos limites estabelecidos. Na literatura, a maior parte dos métodos reportados requer uma prévia decomposição das amostras, o que contradiz a atual tendência de se buscar processos ambientalmente amigáveis de preparo de amostras. Além disso, atualmente não existe um método padrão para a determinação de cromo e ferro em suplementos alimentares.

A técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS) é muito utilizada na determinação de nutrientes em matrizes complexas, pois apresenta alta sensibilidade e seletividade, além de utilizar pequenas quantidades de amostra. A análise direta possibilita a avaliação das amostras com um mínimo ou nenhum pré-tratamento e o uso de soluções padrão aquosas para a calibração. Em outras palavras, a análise direta de amostras elimina processos de decomposição ou dissolução, bem como as possíveis perdas de analito ou contaminações da amostra que podem ocorrer

durante estes processos, o que resulta em menor consumo de reagentes e geração de resíduos, ou seja, um menor custo na análise.

Dessa forma, este trabalho tem por objetivo verificar a conformidade de suplementos alimentares quanto aos recentes limites de cromo e ferro estabelecidos pela ANVISA, através da aplicação de uma nova estratégia analítica que minimize o tempo de análise, a geração de resíduos e os custos, utilizando a análise direta de amostras sólidas por HR-CS GF AAS.

Para o desenvolvimento do método, escolheu-se quatro diferentes suplementos alimentares, representando duas diferentes faixas etárias regulamentadas pela ANVISA. Para otimizar o método analítico, foi analisada a viabilidade do uso da amostragem direta de sólidos e a necessidade do uso de modificador químico. O desempenho do método foi avaliado por meio do estabelecimento de diferentes parâmetros, tais como linearidade, massa característica, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Verificar a conformidade de suplementos alimentares quanto aos recentes limites de cromo e ferro estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da aplicação de uma nova estratégia analítica que minimize o tempo de análise, a geração de resíduos e os custos. Para tanto, será empregada a análise direta das amostras por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS).

### 2.2 Específicos

1 - Realizar uma revisão bibliográfica sobre o estado da arte da análise de suplementos alimentares, demonstrando os métodos espectrométricos já desenvolvidos para determinação de diversos elementos nesse tipo de amostra.

2 - Otimizar um método analítico para determinação simultânea de cromo e ferro: avaliar a possibilidade do uso da análise direta de sólidos, investigar a necessidade do emprego de modificador químico e otimizar o programa de aquecimento do forno de grafite.

3 - Avaliar o desempenho do método proposto através dos parâmetros: linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

4 - Quantificar cromo e ferro nas amostras escolhidas utilizando o método desenvolvido e comparar os resultados obtidos com os indicados nos rótulos dos produtos e com os limites estabelecidos pela ANVISA.

5 - Avaliar os custos do método através do tempo de análise e geração de resíduos, levando em consideração o emprego ou não de procedimentos complexos de preparo de amostra.

### **3 PROPOSTA TECNOLÓGICA**

Considerando a recente regulamentação publicada pela ANVISA para os suplementos alimentares, na qual são estabelecidos além de outros parâmetros, os limites mínimos e máximos de minerais essenciais nestes produtos, há uma eminente demanda tecnológica pelo desenvolvimento de métodos analíticos capazes de avaliar a conformidade destes produtos em relação a legislação vigente.

No Brasil, atualmente não existe um método padrão para a determinação de cromo e ferro em suplementos alimentares. Sabe-se também, que o preparo de amostra é a etapa mais dispendiosa de uma análise, considerando o tempo, custo, uso de reagentes perigosos e geração de resíduos, além do risco de perda de analito e/ou contaminação da amostra.

Portanto, com a realização deste trabalho, espera-se que a tecnologia desenvolvida minimize a etapa de preparo da amostra e possa ser aplicada no controle de qualidade destes produtos, tanto por parte das indústrias quanto dos órgãos fiscalizadores. Por fim, espera-se que essa tecnologia reduza o consumo e manipulação de ácidos concentrados, custos das análises, tempo de preparo das amostras e geração de resíduos, resultando em um aumento da frequência analítica, o que é de grande importância para análises de rotina.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Suplementos alimentares

O segmento de suplementos alimentares está crescendo em muitos países. No Brasil, pesquisas de mercado estimam um crescimento de até 30% em 2018.<sup>1</sup> Em 2015, a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres (ABIAD) realizou uma pesquisa que apontou que 54% dos domicílios brasileiros consomem algum tipo de suplemento alimentar. Sendo o maior uso entre as mulheres de, principalmente, vitaminas, minerais, plantas, ácidos graxos, proteínas, óleos e aminoácidos comercializados na forma de comprimidos, cápsulas, líquidos e pós. Além disso, para 86% dos consumidores a principal finalidade do consumo destes produtos é se manter saudável e complementar a alimentação.<sup>2</sup>

Outros fatores que atraem os consumidores são o custo relativamente baixo, o fácil acesso e a promessa de um produto natural, seguro e sem efeitos colaterais.<sup>3</sup> Há casos em que apenas uma dieta diversificada não é eficiente para suprir as necessidades nutricionais, que se alteram com o envelhecimento, gravidez, doenças ou atividades físicas.<sup>4</sup> No entanto, devido à grande diversidade de composições e alegações, além do forte apelo publicitário, nem sempre o consumidor tem informações suficientes para julgar a qualidade, eficácia e segurança do produto, o que pode ser preocupante quando consumidos durante longos períodos de tempo sem a supervisão adequada.<sup>5</sup> Ao mesmo tempo, estudos demonstram a presença de contaminantes inorgânicos, fungos e bactérias em suplementos alimentares, o que por vezes pode causar efeitos indesejáveis ou até graves intoxicações.<sup>6-10</sup>

### 4.2 Regulamentação

Com o objetivo de diminuir as lacunas regulatórias existentes e a assimetria de informações em relação aos benefícios e riscos destes produtos, recentemente a ANVISA, através da RDC Nº 243 de 26 de julho de 2018, definiu suplementos alimentares como produtos para a ingestão oral, destinados a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis e que apresentam nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos em sua composição.<sup>11</sup> Em conjunto com a

Instrução Normativa complementar N° 28 de mesma data, foram estabelecidas as regras quanto às listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Dessa forma, promovendo o acesso dos consumidores a produtos mais seguros e de qualidade e, conseqüentemente, protegendo-os contra potenciais riscos à saúde.

Nos anexos III e IV desta Instrução Normativa constam as listas dos limites mínimos e máximos estabelecidos, respectivamente, de nutrientes que devem estar contidos nos suplementos alimentares de acordo com a recomendação diária, por grupo populacional de consumo.<sup>12</sup>

Dentre estes nutrientes, estão minerais essenciais para um bom funcionamento do metabolismo, sistema nervoso central, crescimento e desenvolvimento. Esses minerais podem ser divididos em macro minerais (por exemplo, Ca, K, Mg e Na) e micro minerais (por exemplo, Cr, Cu, Fe, Mn, Se e Zn) conforme a quantidade necessária de ingestão. Uma deficiência desses minerais pode levar a anormalidades metabólicas muito diversas e indefinidas. Entretanto, acima dos valores ideais eles podem ser tóxicos.<sup>13-15</sup> Os limites estabelecidos pela ANVISA para o consumo diário de cromo e ferro, objetos de estudo desse trabalho, de acordo com a faixa etária, estão apresentados na Tabela 1.<sup>12</sup> É possível verificar que a quantidade permitida para ferro (em miligramas) é consideravelmente maior que a de cromo (em microgramas) em todas as faixas etárias. Além disso, para ambos os minerais, o limite mínimo estabelecido aumenta conforme a idade (exceto para gestantes e lactantes).

Tabela 1 – Limites de consumo diário de cromo e ferro estabelecidos pela ANVISA de acordo com a faixa etária.

Faixa Etária	Cromo ( $\mu\text{g}$ )		Ferro (mg)	
	Min.	Máx.	Min.	Máx.
0 a 6 meses	0,03	0,3	0,04	39,73
7 a 11 meses	0,825	8,25	1,65	29
1 a 3 anos	1,65	16,5	1,05	33
4 a 8 anos	2,25	22,5	1,5	30
9 a 18 anos	5,25	52,5	2,25	29
> 18 anos	5,25	250	2,7	34,31
Gestantes	4,5	45	4,05	34,71
Lactantes	6,75	67,5	1,5	34,96

Fonte: ANVISA, 2018.

### 4.3 Cromo e ferro

O cromo é um elemento que ocorre naturalmente em rochas, animais, plantas e solo, e no ambiente é encontrado principalmente na forma de cromo trivalente, Cr III, e hexavalente, Cr VI. O cromo (VI) é classificado como cancerígeno e o trato respiratório é o principal alvo da sua toxicidade. Em contrapartida, o cromo (III) é um elemento essencial para seres humanos e desempenha um papel significativo no metabolismo da glicose, proteínas e lipídeos. Além disso, o corpo possui sistemas para reduzir o cromo (VI) a cromo (III). A insuficiência de cromo apresenta sintomas semelhantes aos observados em diabetes e/ou doenças cardiovasculares.<sup>16,17</sup>

Ferro é um micro mineral essencial, pois desempenha um papel significativo no transporte de oxigênio e respiração celular. A deficiência de ferro é considerada a insuficiência nutricional mais comum e afeta aproximadamente 20% da população mundial. A escassez de ferro no corpo pode causar falta de ar, prejuízo no desempenho físico e cognitivo, redução da imunidade e complicações na gravidez. Porém, em excesso, além de se tornar tóxico, pode elevar o risco de câncer e problemas cardiovasculares.<sup>18,19</sup> Doenças como Parkinson e Alzheimer, estão associadas ao acúmulo de ferro no cérebro.<sup>20</sup>

### 4.4 Métodos para a determinação de elementos em suplementos

Para determinar cromo e ferro e cumprir os requisitos da ANVISA, há uma eminente demanda tecnológica, tanto por parte das indústrias quanto dos órgãos fiscalizadores, pelo desenvolvimento de métodos analíticos capazes de avaliar a conformidade destes produtos em relação aos limites estabelecidos. Diversas técnicas analíticas e procedimentos experimentais têm sido propostos nos últimos anos para a identificação e quantificação de diversos elementos em tais amostras. Nas Tabelas 2, 3 e 4 são apresentados os principais trabalhos publicados nos últimos 15 anos (2003 a 2018), para a determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares através de métodos espectrométricos.

As técnicas empregadas nestes trabalhos foram: espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ICP-MS (HPLC-ICP-MS), espectrometria de massas de alta

resolução com plasma indutivamente acoplado (HR-ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de emissão óptica com plasma capacitivamente acoplado (CCP OES), espectrometria de absorção atômica por decomposição térmica e amalgamação (TDA-AAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS), espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV-AAS), espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com ablação a laser (LA-ICP-MS) e espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS).

É possível observar, pela Tabela 2, que os trabalhos descritos comumente empregam diferentes tipos de ácidos, sendo a digestão assistida por micro-ondas em sistema fechado, o procedimento de preparo de amostra mais utilizado. Além disso, a maior parte dos métodos desenvolvidos utilizou técnicas com plasma indutivamente acoplado (ICP) para a determinação dos constituintes inorgânicos em suplementos alimentares. No entanto, sabe-se que apesar de ser uma técnica multielementar, nem sempre as condições experimentais são otimizadas para cada analito, o que a torna suscetível a interferências de transporte e/ou espectrais. Deve-se ressaltar ainda, que a técnica de ICP-MS é particularmente bastante complexa e dispendiosa, tanto no investimento de aquisição, como nos custos de funcionamento.

Tabela 2 – Métodos espectrométricos que utilizaram decomposição ácida como procedimento de preparo de amostra para a determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares.

Técnica	Ano	Elemento	Reagente	Ref.
ICP-MS	2017	Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V	HNO <sub>3</sub>	21
	2015	Cd, Pb, Al, As, Ba, Ni, Sb	HNO <sub>3</sub>	22
	2013	Ar total	HNO <sub>3</sub>	8
	2012	As, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Eu, La, Li, Mo, Nd, Ni, Pb, Rb, Se, Sb, Sm, Sr, Ti, V, Y, Yb	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ou HF	23
	2011	Na, Mg, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Hg, Pb	HNO <sub>3</sub> e HCl	24
	2010	Na, Mg, Al, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Cd, Ba, Hg, Pb	HNO <sub>3</sub> e HCl	25
	2008	Pb	HNO <sub>3</sub>	26
	2007	Pb	HNO <sub>3</sub>	27
	2003	Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, P, Se, Zn	HNO <sub>3</sub>	28
	HPLC-ICP-MS	2013	Ar inorgânico	HCl e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
HR-ICP-MS	2003	Ar, Cd, Hg, Pb	HNO <sub>3</sub>	7
ICP OES	2017	As, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mo, Na, P, Sn, Zn	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21
	2013	As, Bi, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, V, Zn	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	29
	2012	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ou HF	23
CCP OES	2012	Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn	HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O	30
TDA-AAS	2017	Hg	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21
	2010	Pb, Cd, Cr, Ni	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	31
GF AAS	2007	Pb, Cd, Cu, Zn	HNO <sub>3</sub> , HF, HCl e H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	32
	2007	Cr	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	33
	2005	Pb	HNO <sub>3</sub>	34
	2003	Cr, Ca, Fe	HNO <sub>3</sub>	28
	F AAS	2010	Zn	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
2007		Cu, Fe, Mn, Zn	HNO <sub>3</sub>	35
HG-AAS	2010	As	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	31
CV-AAS	2010	Hg	HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	31
	2007	Hg	HNO <sub>3</sub> , HF, HCl e H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	32
CV-AFS	2015	Hg	HNO <sub>3</sub> e HCl	36

Fonte: o autor.

Os trabalhos citados na Tabela 3 reportam o uso de suspensão como preparo de amostra, empregando ácido nítrico, água e triton X-100 (surfactante) como diluentes. A etapa mais importante no preparo de suspensões é o controle do tamanho de partícula, por isso nos três trabalhos apresentados as amostras foram moídas e homogeneizadas até atingir tamanho de partícula  $< 100 \mu\text{m}$ . De qualquer forma, durante a aspiração da amostra (no caso da técnica de ICP), a suspensão precisou ser continuamente agitada por um agitador magnético e o injetor lavado com  $\text{HNO}_3$ , para evitar o entupimento. Apesar do preparo da suspensão também envolver o uso de ácidos, geralmente estes são diluídos, e além disso, normalmente o procedimento é realizado a temperatura ambiente, ou seja, sem a necessidade de altas temperaturas, o que é uma vantagem em relação a digestão ácida. Porém, a amostra ainda é diluída, o que aumenta a possibilidade de contaminação e compromete a precisão e os limites de detecção do método. Além de ser necessário que a amostra se mantenha estável e homogênea até o momento da análise.<sup>37</sup>

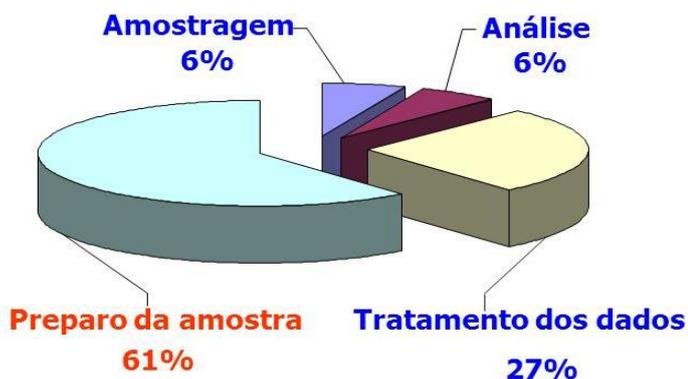
Tabela 3 – Métodos espectrométricos que utilizaram suspensão como procedimento de preparo de amostra para a determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares.

Técnica	Ano	Elemento	Reagente	Ref.
HR-CS GF AAS	2014	Cr, Cu, Fe, Mn, Se, As, Cd, Pb	$\text{HNO}_3$ e Triton X-100	38
ICP OES	2008	Ca, Mg, Mn, Fe, Cr, Al, Ag, B, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Ga, In, Ni, Pb, Zn, As, Se	$\text{HNO}_3$ e $\text{H}_2\text{O}$	39
	2006	Ca, Mg, P, K, Fe, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, V	$\text{HNO}_3$ e $\text{H}_2\text{O}$	40

Fonte: o autor.

Conforme demonstrado, a maior parte dos métodos já reportados requer um preparo de amostra, o que contradiz a atual tendência de se buscar processos ambientalmente amigáveis de preparo de amostras. Além disso, é um procedimento demorado e que pode aumentar a possibilidade de contaminação da amostra e perda de elementos.<sup>3</sup> Na Figura 1 é possível observar que a etapa de preparação da amostra representa cerca de dois terços do tempo total de análise, por isso é essencial desenvolver métodos que simplifiquem essa etapa.<sup>41</sup>

Figura 1 – Influência do preparo de amostra no tempo de uma análise.



Fonte: adaptado de MAJORS, 1991.

Como alternativa, na Tabela 4 estão apresentados os trabalhos que utilizaram a análise direta de amostras sólidas, aplicando um mínimo preparo de amostra. Bu e colaboradores prepararam pastilhas de 2 a 4 mm através do uso de 0,5 g da amostra e uma prensa, para posterior análise por LA-ICP-MS. O SRM NIST 1573a (folha de tomate) foi utilizado como padrão de calibração, sendo empregado também na forma de pastilha.<sup>42</sup> Apesar da preparação ser relativamente fácil e rápida na LA-ICP-MS, há uma dificuldade de encontrar padrões para a calibração com composições semelhantes às amostras para contornar o efeito de matriz, por isso normalmente utiliza-se um CRM para esse fim, o que incrementa custo ao método.

Tabela 4 – Métodos espectrométricos que utilizaram análise direta de amostras sólidas para a determinação de constituintes inorgânicos em suplementos alimentares.

Técnica	Ano	Elemento	Reagente	Ref.
LA-ICP-MS	2013	Mg, Al, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd	-	42
HR-CS GF AAS	2012	Pb	-	43

Fonte: o autor.

Como alternativa ao uso de CRM para a calibração, padrões aquosos podem ser utilizados na técnica de GF AAS. Rêgo e colaboradores empregaram a análise direta de sólidos para determinar chumbo através da HR-CS GF AAS, utilizando soluções padrão aquosas para a calibração. Para isso, as amostras foram secas em um forno a 40 °C por 48 horas e pulverizadas em um moinho criogênico antes da análise.<sup>43</sup> Logo, o uso de forno de grafite como atomizador permite a amostragem direta de sólidos, o que evita ou minimiza a etapa de preparação da amostra.

#### 4.5 Forno de grafite e análise direta de sólidos

A GF AAS é uma das técnicas mais sensíveis e robustas para a determinação de micro minerais, além de possibilitar a análise direta de amostras sólidas e de líquidos complexos, em níveis de  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ou  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . As amostras sólidas podem ser pesadas diretamente na plataforma ou introduzidas na forma de suspensão.<sup>44</sup>

Dentre as principais vantagens da GF AAS está o uso de pequenas quantidades de amostra e baixos limites de detecção. Ao serem inseridas no forno, as amostras líquidas ou sólidas, são submetidas a um programa de aquecimento, no qual cada etapa tem uma função.<sup>45</sup> Primeiro ocorre a secagem, na qual apenas os solventes são evaporados, em seguida, a etapa de pirólise é responsável pela eliminação da matriz sem que ocorra a vaporização do analito presente na amostra, que só deve ocorrer na etapa de atomização. No entanto, por vezes é necessário o auxílio de modificadores químicos para converter o analito em uma forma menos volátil ou os concomitantes em uma forma mais volátil, permitindo o uso de temperaturas de pirólise mais altas, contribuindo para uma separação mais eficaz entre analito e concomitantes durante a etapa de pirólise.<sup>46</sup>

Dessa forma, é possível analisar as amostras diretamente, com um mínimo ou nenhum tratamento prévio, uma vez que o programa de aquecimento (combinado ao uso de modificador químico ou não), depois de otimizado, é responsável pela completa (idealmente) eliminação da matriz da amostra. Como consequência disso, na grande maioria das vezes, pode-se utilizar soluções padrão aquosas para calibração.<sup>45</sup>

Como vantagens da análise direta podemos citar: alta sensibilidade, uso de pequenas quantidades de amostra, redução do tempo e custo total de análise, mínimo risco de contaminação e perda do analito por volatilização ou solubilização incompleta, redução do uso de reagentes perigosos e mínima geração de resíduos, atendendo às necessidades da química verde e sustentável.<sup>46</sup>

Nesse contexto, a GF AAS é uma técnica interessante para a determinação de micro minerais em suplementos alimentares, pois oferece a possibilidade de amostragem direta de sólidos. Além disso, é uma técnica robusta e relativamente barata em termos de investimento e custos de funcionamento.<sup>47</sup>

#### 4.6 Princípio da espectrometria de absorção atômica

A absorção atômica é baseada na medida da absorção de radiação eletromagnética por átomos gasosos no estado fundamental que ocorre durante a etapa de atomização, em um comprimento de onda específico. Através desse fenômeno ocorre a determinação quantitativa de diversos elementos da tabela periódica em diferentes tipos de amostras.<sup>46</sup>

Quando a radiação de frequência específica proveniente de uma fonte externa incide sobre a nuvem atômica, contendo os átomos livres do elemento no estado fundamental, ocorre a atenuação da radiação incidente, devido à absorção da mesma pelos átomos do analito. A lei de Lambert-Beer rege a absorção atômica e permite relacionar de forma diretamente proporcional a absorvância com a quantidade de analito na amostra, como resumidamente pode ser visto na Equação 1.

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = abc \quad (1)$$

Onde A é a absorvância,  $I_0$  é a intensidade total da radiação emitida pela fonte de radiação,  $I_t$  é a intensidade da radiação transmitida (não absorvida), a é a absorvidade, b é a distância percorrida pela radiação e C é a concentração do analito.<sup>48</sup>

Para satisfazer os requisitos da lei de Lambert-Beer, a radiação deve ser monocromática, a distribuição dos átomos deve ser homogênea ao longo do comprimento e da secção transversal do atomizador e sua concentração deve ser baixa, caso contrário ocorre a perda da proporcionalidade entre a concentração do analito e a absorvância medida.<sup>46</sup>

Na metade do século XIX, foram descritos os primeiros equipamentos de espectrometria atômica. Porém, a tecnologia disponível na época era restrita e não permitiu o desenvolvimento da técnica de absorção atômica. No entanto, a partir de 1950 a técnica ganhou destaque com as inovações feitas por Alan Walsh.<sup>49</sup>

Walsh propôs o uso de lâmpadas de cátodo oco (HCL) que apresentavam a vantagem de serem fontes de emissão de radiações específicas, facilitando a observação dos espectros de absorção atômica. Considerando que o cátodo da lâmpada fosse composto por um material puro que pudesse ser excitado, a lâmpada

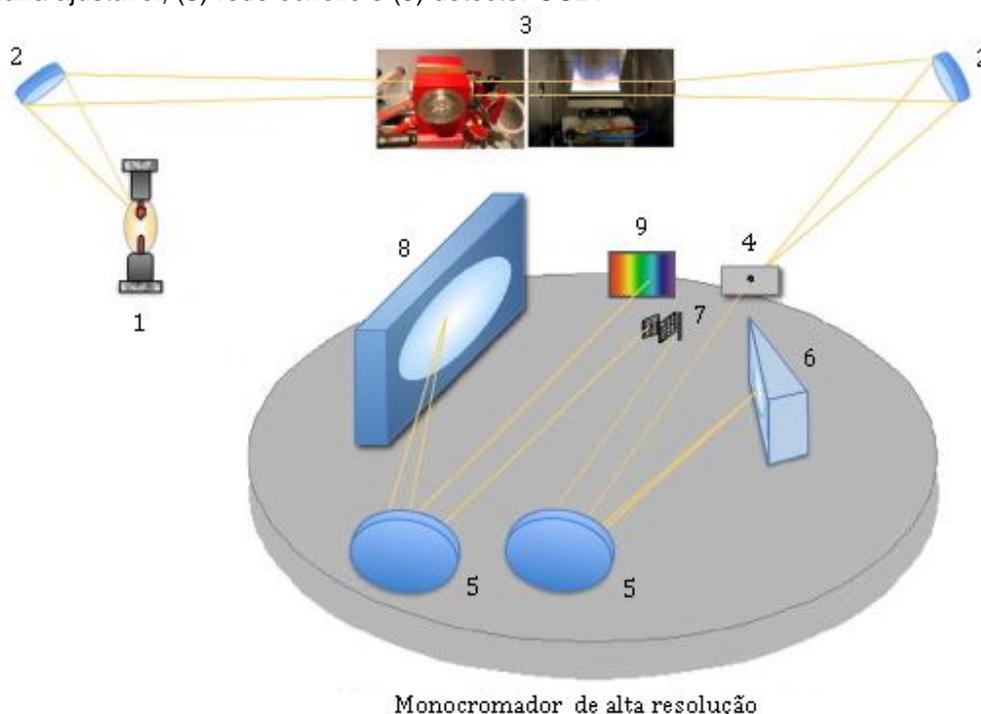
emitiria a radiação específica desse material. Por outro lado, o emprego da HCL tornou a técnica monoelementar. Em relação ao sistema de detecção, o emprego de células fotomultiplicadoras juntamente com um osciloscópio, possibilitou o registro de sinais eletrônicos. Além disso, Walsh descreveu as condições para a obtenção de átomos no estado fundamental através do uso de uma chama, enquanto Boris L'vov introduziu o forno de grafite aquecido eletricamente como atomizador.<sup>46,50</sup>

Walsh também chegou à conclusão que se fosse utilizada uma fonte contínua nas medidas de AAS, seria necessário um monocromador com resolução de aproximadamente 2 pm, que não estava disponível na época. Porém, a ideia de utilizar uma fonte contínua para AAS não foi esquecida.<sup>49</sup>

#### 4.7 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

O primeiro espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua foi descrito por Heitmann e colaboradores em 1996.<sup>49</sup> A configuração de um equipamento atual pode ser observada na Figura 2.<sup>51</sup>

Figura 2 – Esquema de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, onde: (1) lâmpada de arco curto de Xe, (2) espelhos elipsoidais focalizadores, (3) atomizador (chama ou forno de grafite), (4) fenda de entrada, (5) espelhos parabólicos, (6) prisma, (7) fenda intermediária ajustável, (8) rede *echelle* e (9) detector CCD.



O equipamento é composto por uma lâmpada de arco curto de xenônio (1) de alta intensidade que opera no modo *hot spot* com potência de 300 W, que serve como fonte de radiação contínua e cobre uma faixa espectral entre 190 e 900 nm. Após a passagem da radiação pelo volume de absorção (3), a radiação incidente é dirigida a um monocromador duplo de alta resolução (DEMON), composto por um prisma (6) e uma rede *echelle* (8). O prisma faz uma pré-dispersão da radiação e, a fenda intermediária (7) seleciona a parte do espectro de interesse, o qual incidirá na rede *echelle*, fornecendo a alta resolução ao intervalo espectral selecionado ( $\approx 2$  pm por *pixel*).

Em seguida, a radiação transmitida atinge o detector constituído por dispositivos de carga acoplada (CCD), com 588 detectores completamente independentes, 200 dos quais são normalmente utilizados nas análises. Isto significa que todo o ambiente espectral a  $\pm 200$  pm ao redor da linha analítica na região do ultravioleta e até  $\pm 500$  pm na região visível do espectro é monitorado. Com isso, o comprimento de onda é adicionado como uma terceira dimensão à medição convencional da absorvância ao longo do tempo. A disponibilidade de qualquer linha entre 190 e 900 nm, a alta resolução e essa maior visualização do ambiente em torno da linha analítica são de grande importância na detecção e correção de interferências espectrais e na determinação simultânea de elementos.<sup>49,50</sup>

Em relação ao equipamento empregado anteriormente com fonte de linha (LS AAS), a presença de uma única fonte de radiação para todos os elementos e linhas traz algumas vantagens como: simplificação e economia significativa quando muitos elementos precisam ser determinados, possibilidade de realizar correções matemáticas de sobreposições espectrais por monitoramento simultâneo da molécula ou elemento interferente, tornando o sistema de correção de fundo mais eficiente. Outra vantagem é que a intensidade de radiação da fonte contínua utilizada é cerca de duas ordens de grandeza superior à da fonte de linha, o que melhorou consideravelmente o uso das linhas menos intensas e os limites de detecção. Este aspecto é importante para desenvolver métodos que utilizam a análise direta de sólidos, pois se a quantidade de analito presente na amostra estiver em níveis relativamente altos, o uso de linhas alternativas torna-se uma necessidade.<sup>51,52</sup>

A análise direta de sólidos aliada a HR-CS GFAAS é uma alternativa interessante para a determinação de elementos em matrizes complexas, devido à alta sensibilidade e seletividade.<sup>52</sup> Porém, apenas um trabalho que utiliza essa técnica na determinação de cromo e ferro em suplementos alimentares foi encontrado na literatura. Krawczyk determinou As, Cd, Pb, Cr, Cu, Fe, Mn e Se em três multivitamínicos através da técnica de HR-CS GF AAS com o emprego da amostragem em suspensão. Os elementos cromo e ferro foram determinados separadamente utilizando as linhas analíticas com 100% de sensibilidade relativa, 324,754 nm para cromo e 248,327 nm para ferro. Para cromo não foi necessário o uso de modificador químico, enquanto que para ferro utilizou-se nitrato de magnésio ( $Mg(NO_3)_2$ ).<sup>38</sup>

Pesquisas recentes demonstram que esta técnica possibilita determinar cromo e ferro simultaneamente, a partir de uma mesma alíquota de amostra, o que diminui o tempo e custos de análise. Dittert e colaboradores determinaram cromo e ferro simultaneamente em cinco amostras de petróleo bruto empregando a análise direta. A linha mais sensível de cromo (357, 868 nm) e uma linha secundária de ferro (358,120 nm) foram utilizadas, sem a necessidade do uso de modificador químico.<sup>53</sup>

Para que a determinação simultânea seja viável, é necessário que os elementos de interesse apresentem linhas analíticas muito próximas, pois a estreita largura espectral que é monitorada é um fator limitante. Além disso, os elementos também devem apresentar volatilidades semelhantes e razão de sensibilidade entre as linhas na mesma ordem que a razão de concentração nas amostras de interesse. Dessa forma, a partir de um único programa de temperatura, é possível atomizá-los simultaneamente.<sup>52</sup>

Durante o desenvolvimento de um método analítico, é imprescindível avaliar alguns parâmetros de desempenho, a fim de verificar se o método apresenta resultados confiáveis e é adequado à finalidade pretendida.<sup>54</sup> Um método analítico pode ser caracterizado através de diferentes parâmetros como: seletividade, linearidade, faixa de aplicação, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.<sup>55</sup> No desenvolvimento deste método para determinação simultânea de cromo e ferro, os parâmetros analisados foram: linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

## 4.8 Parâmetros de desempenho do método

### 4.8.1 Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito presente na amostra e pode ser expressa por uma curva de calibração.<sup>56</sup> É possível construir uma curva de calibração a partir de medidas em triplicata de, no mínimo, cinco pontos com diferentes quantidades de analito ao longo da faixa de trabalho.

A faixa de trabalho é aquela em que a resposta do sinal tem uma relação linear com o analito. O limite inferior da faixa de trabalho normalmente é o limite de quantificação e o limite superior é a concentração na qual a resposta do equipamento (absorvância integrada, por exemplo) desvia-se da relação linear.<sup>54</sup>

A faixa linear da curva analítica é avaliada através da análise da equação da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados e coeficiente de correlação ( $r$ ). O modelo matemático que descreve a regressão linear é representado pela Equação 2, onde  $y$  é o valor da absorvância,  $a$  é a inclinação da curva analítica (coeficiente angular),  $x$  é a massa ou concentração de analito e  $b$  é o intercepto (interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ).

$$y = ax + b \quad (2)$$

O coeficiente de correlação obtido na regressão linear mede o grau de associação linear entre duas variáveis, o que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida. Quanto mais próximo ao valor de 1, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação deve ser 0,99.<sup>57,58</sup>

A sensibilidade é a variação no sinal de resposta ( $A_{\text{int}}$ ) pela variação da quantidade de analito, isto é, a inclinação da curva de calibração, representada por  $a$  na Equação 2.<sup>56</sup> Na GF AAS o termo massa característica ( $m_0$ ) é utilizado para fornecer uma medida para a sensibilidade do analito sob determinadas condições. Essa é a massa do analito que correspondente a uma absorvância integrada de 0,0044 segundos ou uma absorvância de 0,0044, que representa 1% de absorção.<sup>46</sup>

#### 4.8.2 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) representa a menor quantidade de analito que pode ser medida em um nível de confiança determinado. Enquanto que o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade de analito que pode ser determinada quantitativamente, com precisão e exatidão aceitáveis.<sup>46,56</sup>

#### 4.8.3 Precisão e exatidão

A precisão de um método representa a reprodutibilidade das medidas, isto é, a proximidade entre resultados que foram obtidos da mesma forma. A precisão pode ser avaliada pelo: desvio padrão absoluto (s), intervalo de confiança (IC) ou desvio padrão relativo (RSD). Na análise de traços, são aceitos desvios padrão relativos de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.<sup>57</sup>

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados pelo método desenvolvido em relação a um valor de referência considerado como verdadeiro. Os materiais de referência têm alto grau de pureza e suas características são conhecidas com precisão. Por isso, sempre que possível, estes materiais podem ser utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico.<sup>46,54</sup>

## 5 EXPERIMENTAL

### 5.1 Materiais e reagentes

A descontaminação dos materiais utilizados no preparo das soluções foi realizada através da imersão dos mesmos em solução de 10% (v/v) de ácido nítrico (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) por pelo menos 24 horas. Para o enxágue foi utilizada água ultrapura, com resistividade específica de 18,2 M $\Omega$ .cm, obtida através de um sistema Milli-Q (Milipore, Massachusetts, EUA), e em seguida, os materiais foram mantidos em uma capela de fluxo laminar até a sua completa secagem, a fim de evitar uma possível contaminação por poeira do ambiente.

As soluções padrão de trabalho foram preparadas partindo de soluções estoque monoelementares de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de cromo e ferro (Specsol, Quimlab, Brasil). Para a obtenção de concentrações variadas, as alíquotas foram devidamente diluídas com água ultra pura e acidificadas a 0,014 mol.L<sup>-1</sup> de ácido nítrico bidestilado. Soluções padrão aquosas com concentrações 0,01 a 0,1 mg.L<sup>-1</sup> para cromo e 1 a 100 mg.L<sup>-1</sup> foram utilizadas para a construção da curva de calibração. A solução de modificador químico de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,06% (m/v) foi preparada através da diluição de uma solução estoque de 1% (m/v) (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) e a solução de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 g.L<sup>-1</sup> foi preparada através da dissolução do sal (Merck, Rio de Janeiro, Brasil), ambas com água ultra pura.

Todas as soluções e amostras utilizadas nesse trabalho foram armazenadas em frascos de polietileno que passaram pelo procedimento de descontaminação mencionado.

### 5.2 Amostras e preparo de amostras

As amostras de suplemento alimentar em pó foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Porto Alegre. As quatro amostras analisadas são produtos indicados para diferentes grupos populacionais e apresentam diferentes características, conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Amostras e suas respectivas características.

Amostra	Faixa etária	Contém açúcar	Conc. de cromo ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Conc. de ferro ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )
A	Adultos e idosos	Não	-	-
B	Adultos e idosos	Sim	200	69
C	0 a 6 meses	Não	-	51
D	0 a 6 meses	Não	-	60

Fonte: o autor.

Todas as amostras foram secas em estufa (De Leo, modelo A2SE), na temperatura de 70 °C por duas horas. Após a secagem, as amostras de suplementação infantil C e D foram passadas por malha com poros de 150  $\mu\text{m}$ , visando melhorar a repetibilidade dos resultados. A amostra B, que contém açúcar em sua composição, foi macerada em almofariz de ágata antes da secagem.

Para avaliar a exatidão do método foi analisado o material de referência padrão (SRM) de ovo em pó, *whole egg powder* - NIST SRM 8415 (*National Institute of Standards and Technology*).

### 5.3 Instrumentação

As análises das amostras de suplemento alimentar foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo contrAA 700 (Analytik Jena AG, Alemanha), equipado com dois diferentes tipos de atomizadores: chama e forno de grafite com aquecimento transversal. Este equipamento é composto por uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade operando no modo *hot spot*, que serve como fonte de radiação contínua e cobre uma faixa espectral entre 190 e 900 nm. Além disso, possui um monocromador duplo de alta resolução e um detector de carga acoplada (CCD).

Nas medidas dos sinais de absorvância foram utilizados os comprimentos de onda de 357,868 nm e 358,120 nm, que correspondem à linha analítica de 100% de sensibilidade relativa para o cromo e de 1% para o ferro, respectivamente, sendo monitorado apenas o *pixel* central para ambos os elementos. O tempo utilizado para integração do sinal de absorvância foi de 6 segundos.

Forno e plataforma para amostragem sólida, ambos de grafite e com recobrimento pirolítico, foram utilizados nas análises. Uma balança micro analítica M2P (Sartorius, Gottingen, Alemanha) foi utilizada para pesar as amostras e o SRM

diretamente sobre a plataforma, que em seguida foi introduzida no forno de grafite usando um par de pinças pré-ajustado que faz parte do módulo amostrador para sólidos (Analytik Jena AG, Alemanha).

As soluções padrão e o modificador químico foram inseridos manualmente sobre a plataforma com auxílio de micropipetas (BRAND, modelo Transferppete S), com volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$  para ambos. Argônio com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás de purga, com vazão de 2  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  em todas as etapas de aquecimento, exceto na de atomização, quando o fluxo foi interrompido. O programa de aquecimento para a determinação simultânea de cromo e ferro em amostras de suplemento alimentar está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação simultânea de cromo e ferro *via* HR-CS GF AAS utilizando a análise direta de amostras sólidas.

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rampa de aquecimento ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Tempo (s)
Secagem1	110	3	20
Secagem2	150	5	20
Pirólise	1300	100	30
Atomização	2600	FP*	6
Limpeza	2650	500	4

\*FP: *Full Power* ( $\approx 3000\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ )

Fonte: o autor.

#### 5.4 Linearidade e faixa de trabalho

Para a determinação de cromo e ferro nas amostras de suplemento alimentar e no SRM, foram construídas as curvas de calibração utilizando um branco e duas soluções padrão aquosas multielementares com concentrações de 0,02 e 0,05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cromo e de 2 e 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ferro.

Foram utilizados diferentes volumes dessas soluções a fim de se obter massas entre 0,1 e 1,0 ng de cromo e 10 e 100 ng de ferro, analisadas em triplicata. As condições do programa de aquecimento utilizadas na curva de calibração foram previamente otimizadas e o sinal analítico foi avaliado através da área dos sinais de absorvância *versus* tempo.

### 5.5 Massa característica

A massa característica ( $m_o$ ) do método foi calculada através da relação estabelecida com um dos padrões da curva de calibração (0,2 ng de cromo e 20 ng de ferro), de acordo com a Equação 3. Onde  $m$  é a massa do padrão e  $A_{int}$  é a absorvância integrada correspondente.

$$m_o = \frac{0,0044m}{A_{int}} \quad (3)$$

### 5.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados através de dez medidas experimentais do branco, realizadas a partir da inserção da plataforma no atomizador com 10  $\mu$ L da solução de modificador químico. Os valores foram calculados utilizando as Equações 4 e 5.

$$LOD = \frac{3s}{a} \quad (4)$$

$$LOQ = \frac{10s}{a} \quad (5)$$

Onde  $s$  é o desvio padrão de dez medidas do branco e  $a$  é o coeficiente angular da equação da reta da curva de calibração (inclinação da reta).

### 5.7 Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada através do RSD, também conhecido como coeficiente de variação (CV), pois este muitas vezes expõe de forma mais clara a qualidade dos dados adquiridos. O valor do RSD pode ser calculado através da Equação 6, onde  $s$  é o desvio padrão do conjunto de medidas e  $\bar{x}$  é a média dessas mesmas medidas.<sup>56</sup>

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

A exatidão do método foi verificada através da análise de seis replicatas do material de referência padrão de ovo em pó, NIST SRM 8415. O valor médio da

concentração obtida para cromo e ferro foi comparado estatisticamente com os valores certificados do SRM para estes elementos, utilizando o teste t de Student.

O teste t de Student é muito utilizado para comparar a média de um grupo de medidas com um valor de referência e exprimir o nível de confiança associado ao significado da comparação. Se  $t_{\text{tabelado}} > t_{\text{calculado}}$  significa que os valores obtidos estão concordantes com o valor de referência do SRM e então, que método é exato.<sup>59</sup> O valor de t é calculado pela Equação 7 e o valor tabelado depende do nível de confiança escolhido, no caso deste trabalho de 95% e dos graus de liberdade (n-1).

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s} \sqrt{n} \quad (7)$$

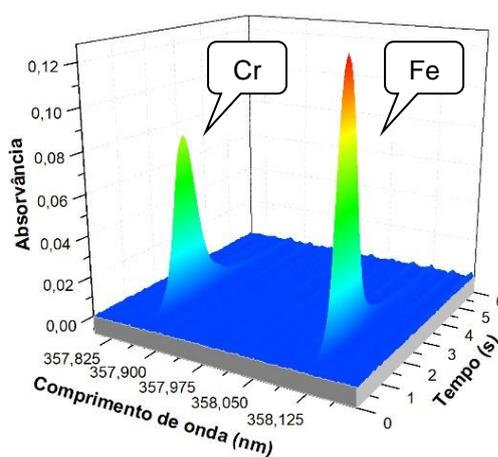
Onde  $\bar{x}$  é a média do valor obtido para as amostras,  $\mu$  é o valor de referência,  $s$  é o desvio padrão obtido para as mesmas amostras e  $n$  é o número de medidas realizadas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Escolha do comprimento de onda

Conforme descrito por Dittert e colaboradores, é possível determinar cromo e ferro simultaneamente utilizando HR-CS GF AAS.<sup>53</sup> Para tanto, foram realizados testes preliminares com as amostras de suplemento alimentar para verificar se a razão de concentração de cromo e ferro estava na mesma ordem da razão de sensibilidade entre as linhas analíticas. Como pode ser visto na Figura 3, é possível realizar a determinação simultânea dos elementos utilizando as linhas de 357,868 nm para cromo e 358,120 nm para ferro, que correspondem a 100% e 1% de sensibilidade relativa, respectivamente.

Figura 3 – Espectros de absorvância resolvidos temporalmente na vizinhança da linha analítica de cromo e ferro da amostra B. Tp: 1300 °C; Ta: 2600 °C.



Fonte: o autor.

### 6.2 Estudo do uso de modificador químico

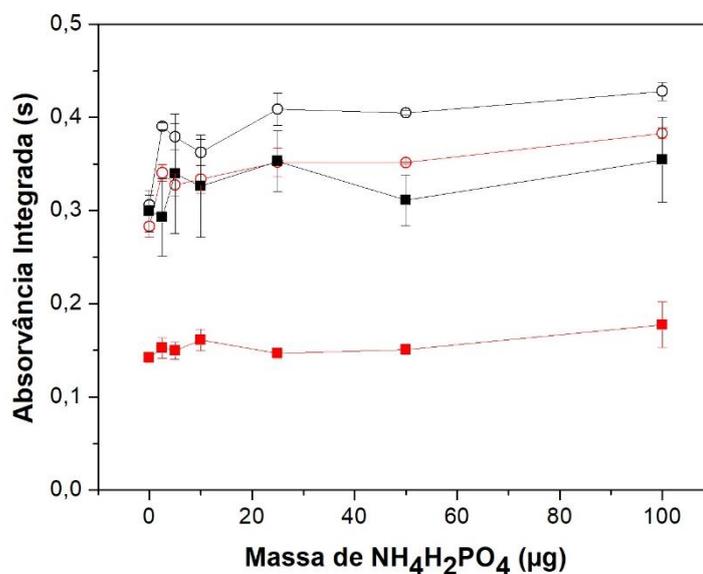
Inicialmente foram realizados testes para verificar a necessidade do uso de modificador químico na determinação de cromo e ferro em amostras de suplemento alimentar. Para isso, a amostra B e uma solução padrão aquosa multielementar com massas de 0,5 ng de cromo e 100 ng de ferro foram analisadas, porém os desvios padrão relativos obtidos eram muito elevados.

Portanto, os modificadores químicos, em solução, de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  foram testados com base na literatura, devido as suas capacidades de melhorar a estabilidade térmica dos analitos e facilitar a volatilização da matriz, respectivamente.<sup>46</sup> Massas entre 1,5 e 20  $\mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  foram investigadas para cromo e ferro no padrão, com temperatura de pirólise de 1100 °C e atomização de 2600 °C. Ainda que os desvios padrão relativos calculados obtidos foram superiores a 5% para todas as massas de modificador testadas, observou-se um aumento da  $A_{\text{int}}$  do ferro com o uso de modificador químico. No entanto, a presença de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  contribuía negativamente no perfil analítico de cromo. A partir destes resultados, foi preparada uma solução com  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , na tentativa de proporcionar uma condição ótima para ambos os elementos, porém sem sucesso.

Em seguida, foi investigado o comportamento de cromo e ferro no padrão apenas na presença do modificador químico de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Massas entre 2,5 e 100  $\mu\text{g}$  foram testadas e os resultados foram satisfatórios, com RSD inferior a 5% para todos os pontos avaliados. Então, a amostra B foi analisada empregando as mesmas massas de modificador previamente testadas no padrão.

Na Figura 4 observa-se que os valores de  $A_{\text{int}}$  do padrão são maiores na presença de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  para ambos os elementos, em comparação à ausência de modificador químico, sendo possível verificar o mesmo comportamento para ferro na amostra. Considerando as absorvâncias e os desvios padrão obtidos, é possível observar que as massas de 25, 50 e 100  $\mu\text{g}$  apresentam resultados estáveis para  $A_{\text{int}}$  de cromo e ferro, tanto no padrão quanto na amostra. Logo, a massa de 25  $\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  foi escolhida para os demais experimentos, pois é a menor quantidade de reagente necessária para se obter maiores valores de  $A_{\text{int}}$  e além disso, o RSD da amostra nesse ponto foi inferior a 10% para cromo e ferro.

Figura 4 – Influência da massa de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  como modificador químico para: amostra de suplemento alimentar B, absorvância normalizada para 1 mg, cromo (■) e ferro (■); 10  $\mu\text{L}$  de soluções padrão aquosa com 0,5 ng de cromo (○) e 100 ng de ferro (○). Tp: 1300 °C; Ta: 2600 °C.



Fonte: o autor.

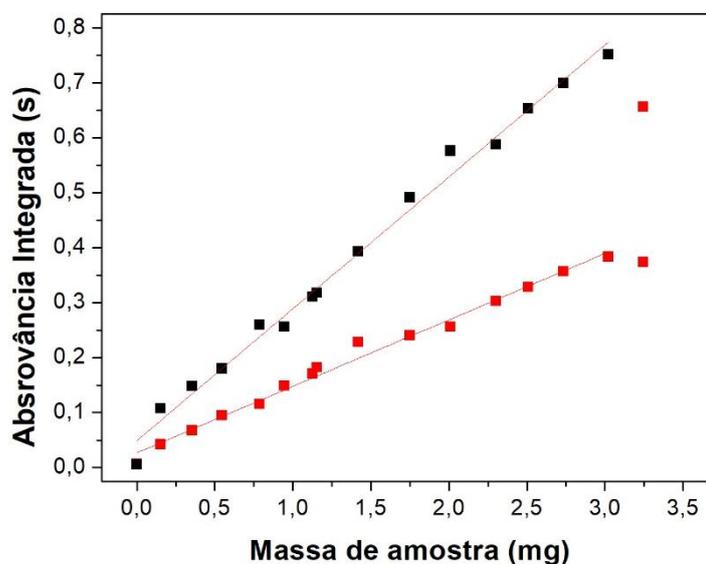
### 6.3 Estudo da influência da massa de amostra

Foi avaliado se a massa de amostra inserida no forno de grafite teria alguma influência sobre a linearidade de resposta.

Para avaliar a correlação entre as duas variáveis, massa de amostra e a  $A_{\text{int}}$  obtida para cromo e ferro, foram analisadas diferentes massas (entre 0,150 e 3,000 mg) de suplemento alimentar B (Figura 5). Após, realizou-se as regressões lineares para as duas curvas e os resultados demonstraram que houve uma alta correlação, coeficientes de correlação de 0,9943 e 0,9952 para cromo e ferro, respectivamente, entre as variáveis investigadas.

Portanto, qualquer massa de amostra no intervalo de 0,150 a 3,000 mg pode ser utilizada para a análise das amostras. Para massas a partir de 3,200 mg é possível observar um desvio da linearidade.

Figura 5 – Influência da massa de amostra de suplemento alimentar B no sinal analítico de cromo (■) e ferro (■). Tp: 1300 °C; Ta: 2600 °C; modificador químico: 25 µg de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.



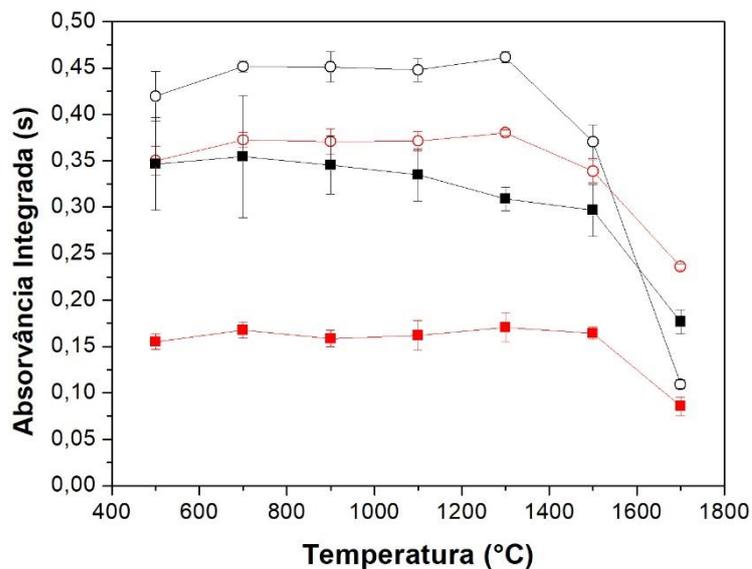
Fonte: o autor.

#### 6.4 Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para cromo e ferro a fim de otimizar o programa de aquecimento do forno de grafite. Para isso, foi utilizado a amostra B e 10 µL de uma solução aquosa padrão multielementar contendo cromo e ferro, com concentrações de 50 µg.L<sup>-1</sup> (0,5 ng) e 10 mg.L<sup>-1</sup> (100 ng), respectivamente, sempre com a adição de 10 µL de uma solução de modificador químico (2,5 g.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Durante a otimização da temperatura de pirólise (Tp), a temperatura de atomização (Ta) foi mantida em 2600 °C.

A temperatura de pirólise foi avaliada entre 500 e 1700 °C. Para a amostra não foi possível realizar medidas em temperaturas inferiores à 500 °C, pois a matriz não foi completamente eliminada, observando-se fumaça na etapa de atomização. De qualquer forma, é possível verificar na Figura 6 um patamar de A<sub>int</sub> até 1300 °C, tanto para cromo quanto para ferro, ocorrendo um decréscimo a partir de 1500 °C. A amostra apresentou uma pequena redução no valor de A<sub>int</sub> de ferro em 1300 °C, no entanto, considerando-se os desvios padrão para as absorvâncias obtidas em temperaturas inferiores (entre 500 e 1100 °C), a redução não é expressiva.

Figura 6 – Curvas de pirólise para: amostra de suplemento alimentar B, absorvância normalizada para 1 mg, cromo (■) e ferro (■); 10 µL de soluções padrão aquosa com 0,5 ng de cromo (○) e 100 ng de ferro (○). Ta: 2600 °C.



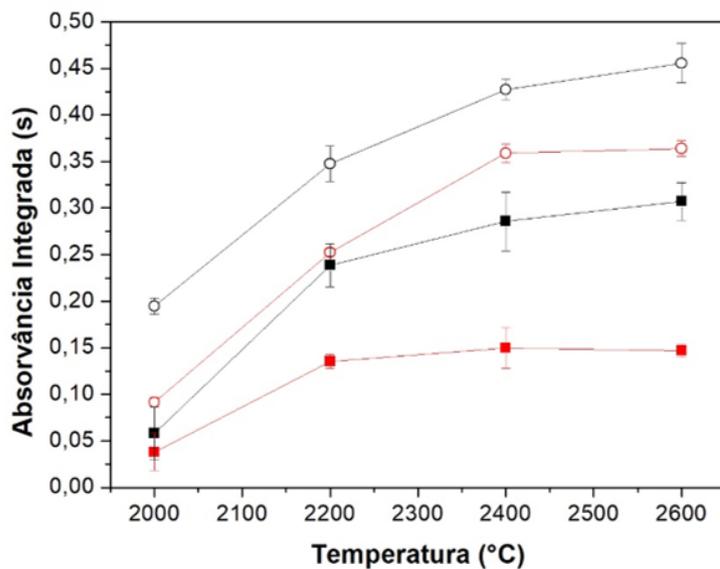
Fonte: o autor.

Logo, a temperatura de pirólise foi definida em 1300 °C, pois nessa temperatura o desvio padrão relativo da amostra foi inferior a 10% para cromo e ferro e também garantimos a máxima eliminação da matriz, inclusive em outras amostras com igual ou maior complexidade.

Após a otimização da temperatura de pirólise foram construídas as curvas de atomização. Mantendo a temperatura de pirólise fixa em 1300 °C, a temperatura de atomização foi avaliada entre 2000 e 2600 °C.

Como pode ser observado na Figura 7, entre 2400 e 2600 °C o sinal do cromo permaneceu estável, tanto para a amostra quanto para o padrão. Porém, para ferro houve um pequeno aumento no valor de  $A_{int}$  em 2600 °C.

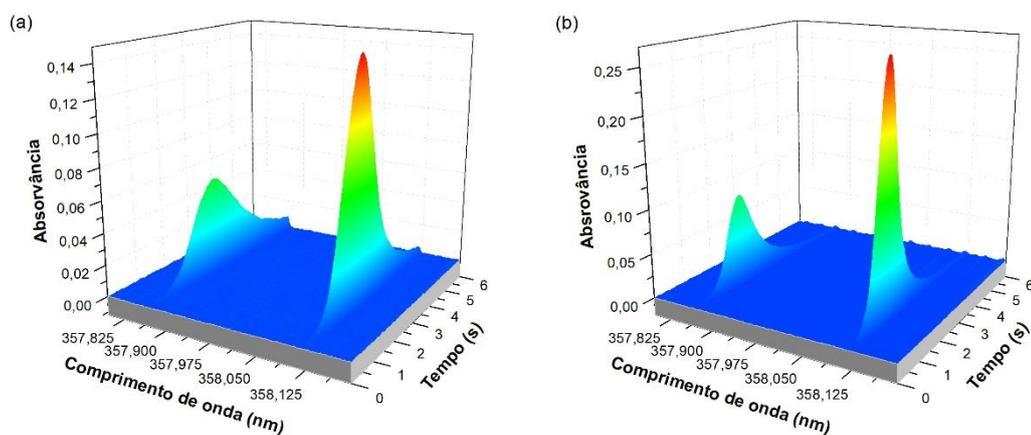
Figura 7 – Curvas de atomização para: amostra de suplemento alimentar B, absorvância normalizada para 1 mg, cromo (■) e ferro (■); 10  $\mu\text{L}$  de soluções padrão aquosa com 0,5 ng de cromo (○) e 100 ng de ferro (○).  $T_p$ : 1300  $^{\circ}\text{C}$ .



Fonte: o autor.

Então, foi escolhida a temperatura de atomização de 2600  $^{\circ}\text{C}$ , levando-se em consideração os maiores valores de  $A_{\text{int}}$  e melhor perfil do sinal analítico. Pode-se observar na Figura 8, que há uma diminuição das caudas dos picos dos dois analitos, com o aumento da  $T_a$ .

Figura 8 – Espectros de absorvância resolvidos temporalmente na vizinhança da linha analítica de cromo e ferro da amostra B: (a) 1,024 mg de amostra B,  $A_{\text{int}}$  cromo: 0,15482 s,  $A_{\text{int}}$  ferro: 0,28302 s,  $T_a$ : 2400  $^{\circ}\text{C}$ ; (b) 1,233 mg de amostra B,  $A_{\text{int}}$  cromo: 0,15234 s,  $A_{\text{int}}$  ferro: 0,32737 s,  $T_a$ : 2600  $^{\circ}\text{C}$ .



Fonte: o autor.

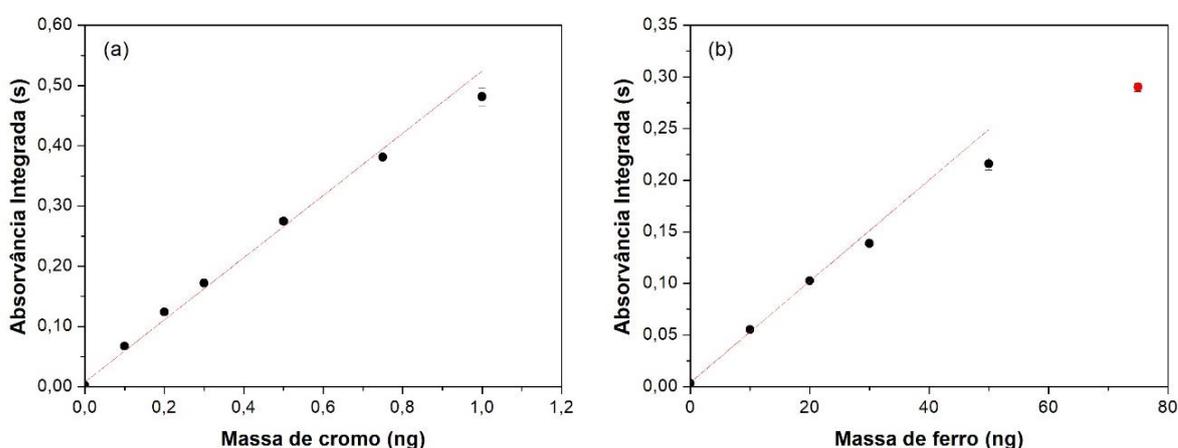
## 6.5 Parâmetros de desempenho do método

### 6.5.1 Curva de calibração, LOD, LOQ e $m_0$

Após a otimização das condições experimentais foram estabelecidos os parâmetros de desempenho do método. Para isso, foram construídas as curvas de calibração empregando soluções padrão aquosas multielementares com concentrações de 0,02 e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de cromo em conjunto com 2 e 5 mg.L<sup>-1</sup> de ferro. Foram utilizados diferentes volumes dessas soluções a fim de se obter as massas de 0,1 a 1,0 ng de cromo e 10 a 100 ng de ferro.

Na Figura 9 (a) é possível observar que a curva de calibração do cromo se mostrou linear para toda a faixa de massa estudada, com  $A_{int}$  entre 0,0 e 0,5 s, aproximadamente. Logo, a faixa de trabalho para o cromo foi estabelecida entre o limite de quantificação de 0,02 e 1,00 ng. Enquanto que na Figura 9 (b) é possível observar que a curva de calibração do ferro se mostrou linear até a massa de 50 ng, com absorvâncias entre 0,0 e 0,2 s, aproximadamente. A partir desse ponto, ocorre um desvio na lei de Lambert-Beer e o coeficiente de correlação ( $r$ ) apresenta valores inferiores a 0,99. Assim, a faixa de trabalho para o ferro foi de 0,58 a 50 ng.

Figura 9 – Curvas de calibração para os padrões aquosos de cromo (a) e ferro (b). Tp: 1300 °C, Ta: 2600 °C.



Fonte: o autor.

Os valores obtidos para os parâmetros LOD e LOQ, assim como as equações da reta obtidas para as curvas de calibração e a  $m_0$  são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros obtidos para a determinação simultânea de cromo e ferro e amostras de suplemento alimentar.

Parâmetros	Cromo	Ferro
Equação da reta	$A_{int} = 0,5165m \text{ (ng)} + 0,0078$	$A_{int} = 0,0049m \text{ (ng)} + 0,0040$
r	0,9954	0,9957
LOD*	0,005 ng / 1,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	0,17 ng / 0,06 $\text{mg.kg}^{-1}$
LOQ*	0,017 ng / 5,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	0,58 ng / 0,19 $\text{mg.kg}^{-1}$
$m_o$	7,1 pg	0,9 ng

\*Valores em concentração calculados para 3 mg de amostra.

Fonte: o autor.

Na Tabela 7 são apresentados os valores de LOD e LOQ do instrumento, bem como os do método. Os valores do instrumento foram obtidos conforme descrito no item 5.6 da Parte Experimental. Enquanto que os valores do método, expressos em concentração, foram calculados tendo em vista a massa máxima de amostra que pode ser pesada, de 3 mg. Os valores obtidos estão abaixo dos limites mínimos de cromo e ferro estabelecidos pela ANVISA em suplementos alimentares (Tabela 1), de pelo menos, 0,03  $\mu\text{g}$  e 0,04 mg, respectivamente. Logo, o método desenvolvido pode ser aplicado para a determinação destes elementos.

Dittert e colaboradores determinaram simultaneamente cromo e ferro em amostras de petróleo bruto utilizando as mesmas linhas analíticas deste trabalho e obtiveram a  $m_o$  de 3,8 pg para cromo e 0,5 ng para ferro.<sup>53</sup> A massa característica obtida com o método proposto foi maior para ambos os elementos, principalmente para cromo, no entanto, esses valores estão de acordo com os indicados pelo fabricante do espectrômetro, podendo ser considerados satisfatórios. Em relação ao LOD e LOQ, os valores já reportados foram respectivamente, 1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para cromo e 0,6  $\text{mg.kg}^{-1}$  e 2  $\text{mg.kg}^{-1}$  para ferro, considerando-se o emprego de 4 mg de amostra para cada replicata. Logo, os limites encontrados neste trabalho para cromo são muito próximos aos já reportados e para ferro, cerca de 10 vezes melhor, considerando as mesmas massas pesadas por Dittert.

### 6.5.2 Precisão e exatidão

Em todas as medidas realizadas durante o desenvolvimento do método, para padrões, amostras e SRM, foi calculado o valor do RSD. O mesmo esteve sempre abaixo de 5% para as soluções padrão aquosas e abaixo de 15% para as amostras

e SRM (exceto para o cromo na amostra C). Considerando a complexidade da amostra, esses resultados são satisfatórios.<sup>57</sup>

Para avaliar a exatidão do método proposto foi realizada a análise do SRM de ovo em pó, NIST SRM 8415, utilizando soluções padrão aquosas para a calibração. Foram realizadas seis medidas e então, a concentração média de cromo e ferro no material foi calculada. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Avaliação da exatidão do método proposto através da análise do SRM de ovo em pó. n: 6.

NIST SRM 8415	Cromo	Ferro
Valor certificado ( $\text{mg.kg}^{-1} \pm \text{IC}$ )	$0,37 \pm 0,18$	$112 \pm 16$
Valor encontrado ( $\text{mg.kg}^{-1} \pm s$ )	$0,40 \pm 0,05$	$103 \pm 12$
$t_{\text{calculado}}$	1,358	-1,873

Fonte: o autor.

Utilizando o teste t de Student com um nível de confiança de 95% e seis medidas (graus de liberdade igual a 5), o  $t_{\text{tabelado}}$  corresponde a 2,571.<sup>59</sup> Como  $t_{\text{tabelado}}$  é maior que  $t_{\text{calculado}}$ , os valores encontrados de cromo e ferro no material de referência foram concordantes com os valores certificados. Logo, o método desenvolvido apresenta a exatidão adequada para as determinações de cromo e ferro em suplemento alimentar.

## 6.6 Determinação de cromo e ferro em suplementos alimentares

Após a determinação dos parâmetros de desempenho do método, foram realizadas as análises das amostras de suplemento alimentar utilizando as condições experimentais previamente otimizadas. Na Tabela 9 são apresentados os resultados obtidos para a quantificação de cromo e ferro em suplementos alimentares por HR-CS GF AAS, empregando a análise direta.

Tabela 9 – Quantificação de cromo e ferro nas amostras de suplemento alimentar *via* HR-CS GF AAS.

Amostra	Faixa etária	Conc. de cromo ( $\mu\text{g.kg}^{-1} \pm s$ )	RSD (%)	Conc. de ferro ( $\text{mg.kg}^{-1} \pm s$ )	RSD (%)
A	Adultos e idosos	$97 \pm 9$	9	$10 \pm 1$	10
B	Adultos e idosos	$302 \pm 11$	4	$75 \pm 11$	14
C	0 a 6 meses	$40 \pm 20$	49	$33 \pm 4$	12
D	0 a 6 meses	$49 \pm 5$	11	$109 \pm 9$	8

Fonte: o autor.

Observa-se que os valores de cromo e ferro ficaram na faixa de concentração de 40 a 302  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e de 10 a 109  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente, todos acima do LOQ para ambos os analitos. Os valores de RSD são satisfatórios, exceto para a amostra C, em que o RSD obtido foi bem elevado, indicando que o analito não está homogeneamente distribuído na amostra. Logo, deve ser feito um estudo de tamanho de partícula para essa amostra, afim de avaliar a micro homogeneidade e o efeito desta no RSD.

Considerando as informações apresentadas no rótulo dos produtos (Tabela 5), há indicação da presença de cromo na amostra B e de ferro nas amostras B, C e D. No entanto, foi verificado que estes elementos estão presentes em todas as amostras. A concentração de cromo encontrada na amostra B é cerca de 50% maior que o valor do rótulo. Os valores encontrados para ferro nas amostras C e D diferem daqueles indicados no rótulo, sendo o valor encontrado para a amostra C menor que o indicado, enquanto que para a amostra D, maior. O valor de ferro determinado para a amostra B foi o único próximo ao declarado, com uma diferença menor que 10%.

O rótulo do produto B, indicado para adultos e idosos, recomenda a dose diária de 70 g. A resolução da ANVISA estabelece que para maiores de 18 anos, exceto gestantes e lactantes, a faixa permitida para cromo em suplementos alimentares é de 5,25 a 250  $\mu\text{g}$ , e para ferro, entre 2,7 e 34,31  $\text{mg}$ . Logo, é possível concluir que o produto está de acordo com a legislação.

Os produtos C e D, para suplementação infantil, recomendam a dose diária adequada conforme a idade. Para ferro, a legislação vigente estabelece que de 0 a 6 meses, o limite mínimo em suplementos alimentares é 0,04  $\text{mg}$  e o máximo 39,73  $\text{mg}$ . Considerando a concentração declarada no rótulo (Tabela 5) e a determinada através do método desenvolvido (Tabela 9), os produtos estão de acordo com a legislação.

Para cromo, os valores estabelecidos na legislação são 0,03 e 0,3  $\mu\text{g}$ , para mínimo e máximo, respectivamente. Como não há a informação da presença de cromo no produto D, foi utilizada a concentração determinada para verificar a conformidade com a legislação. A menor dose diária indicada pelo fabricante (79 g, para bebês com até 2 semanas de vida) representa 3,9  $\mu\text{g}$  de cromo, um valor 10 vezes maior que o permitido. Enquanto que na maior dose diária (123 g, para bebês

entre 4 e 5 meses de vida) o valor é de 6,0 µg de cromo, o que está muito acima do permitido, sugerindo que a ingestão desse produto pode vir a causar algum problema de saúde relacionado a presença de cromo em excesso.

O produto A, indicado para adultos e idosos, não informa no rótulo a quantidade que deve ser ingerida por dia, não sendo possível concluir se os valores de cromo e ferro estão de acordo com os limites estabelecidos pela ANVISA.

## 7 AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Com o objetivo de realizar uma avaliação econômica envolvendo a aplicação do método proposto, foi realizada uma comparação qualitativa entre as etapas do preparo de amostra, uso de reagentes e geração de resíduos levando em consideração o emprego ou não de procedimentos complexos de preparo de amostra. Para tanto, foi utilizado um procedimento clássico de digestão assistida por micro-ondas reportado na literatura.<sup>24</sup> Esta comparação é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Comparação qualitativa entre as etapas do preparo de amostra, considerando o emprego ou não de procedimentos complexos de preparo de amostra.

Etapas do preparo de amostra	Análise direta de sólidos	Digestão assistida por micro-ondas <sup>24</sup>
Secar	X	-
Moer	X	X
Peneirar	X	X
Pesar	-	X
Digerir	-	X
Filtrar	-	X
Avolumar	-	X

Fonte: o autor.

É possível visualizar que o procedimento de preparo de amostra para a análise direta de sólidos empregado no método proposto apresenta metade das etapas do procedimento de digestão assistida por micro-ondas. Desconsiderando as etapas de moagem e controle do tamanho de partícula que são comuns para ambos os métodos, o tempo total do preparo de amostra utilizado para a análise direta foi de 2 horas (tempo da secagem das amostras na estufa).

Para a digestão, estima-se que o tempo necessário para pesar uma amostra em triplicata e adicionar os reagentes, seja em torno de 15 minutos. Considerando quatro amostras, mesmo número de amostras analisadas no desenvolvimento deste método, são 60 minutos. O programa de digestão utilizado tem duração de 20 minutos, supondo o mesmo tempo para o resfriamento dos tubos, são 40 minutos. Após o resfriamento, ocorre a abertura dos frascos, filtração, transferência quantitativa da amostra para frascos volumétricos e aferição do volume, o que ocupa em torno de 30 minutos por amostra, totalizando 2 horas neste caso. Ao final do

procedimento, realiza-se a limpeza dos frascos. Logo, é necessário em torno de 4 horas para realizar todas as etapas mencionadas, sendo que a maior parte do procedimento requer um analista para executá-lo.

O uso de reagentes e equipamentos durante o preparo e análise das amostras também foi comparado, bem como a geração de resíduos líquidos. As informações do uso ou não de reagentes e equipamentos são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Comparação qualitativa entre o uso de reagentes e equipamentos durante o preparo e análise das amostras, considerando o emprego ou não de procedimentos complexos de preparo de amostra.

Material necessário	Análise direta de sólidos	Digestão assistida por micro-ondas
HNO <sub>3</sub> diluído	X	-
HNO <sub>3</sub> concentrado	-	X
HCl concentrado	-	X
Modificador químico	X	-
Estufa	X	-
Balança analítica	-	X
Balança micro analítica	X	-
Micro-ondas	-	X

Fonte: o autor.

Como pode ser observado na Tabela 11, na análise direta de sólidos, os únicos reagentes utilizados foram HNO<sub>3</sub> diluído (50 µL no preparo de cada um dos padrões) e o modificador químico durante as análises. Entretanto, na digestão, foram utilizados ácidos concentrados de alta pureza, sendo necessários 8 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 2 mL de HCl concentrado para cada replicata, além do branco, o que acarreta em um aumento do custo da análise, devido ao preço dos reagentes, e também em uma maior geração de resíduos líquidos (em torno de 60 mL de resíduos para cada amostra digerida). Na análise direta, os únicos resíduos líquidos gerados são advindos do descarte das soluções padrão utilizadas na curva de calibração, em torno de 20 mL no total.

O custo estimado dos equipamentos utilizados em ambos os preparos é de R\$ 80 mil, cada. Sendo a micro balança utilizada para a pesagem das amostras sólidas diretamente sobre a plataforma e o micro-ondas, os equipamentos mais dispendiosos.

Para a quantificação da amostra, na análise direta foram realizadas cinco medidas utilizando em torno de 0,5 mg em cada, enquanto que na digestão, foram realizadas triplicatas empregando 200 mg em cada. O uso de uma menor quantidade de amostra representa menos tempo realizando as etapas iniciais de moagem e controle do tamanho de partícula, o que também é uma vantagem da análise direta.

Considerando as informações apresentadas nas Tabela 10 e Tabela 11, é possível concluir que a análise direta apresenta menos etapas de preparo de amostra, além de um menor custo com reagentes, o que minimiza o custo do método e a geração de resíduos líquidos.

Ainda se fosse feita uma avaliação econômica comparando a técnica de HR-CS GF AAS com análise direta de sólidos e a técnica de ICP-MS com digestão em micro-ondas (maioria dos métodos já reportados na literatura), provavelmente a redução dos custos seria ainda mais significativa, devido ao alto custo operacional, principalmente com gases do ICP-MS.

## 8 IMPACTO AMBIENTAL

A busca por procedimentos ambientalmente amigáveis é um desafio da química moderna. Por isso, desenvolver métodos que minimizam o consumo de ácidos concentrados e a geração de resíduos é de grande importância para o meio ambiente.

O emprego da análise direta como preparo de amostra em ensaios de rotina é uma boa alternativa em relação aos procedimentos clássicos de decomposição ácida, pois além de reduzir os custos de análise, tempo de preparo de amostra e risco de acidentes na manipulação dos ácidos, não gera resíduos líquidos como na digestão ácida e contribui positivamente para a química verde.

## 9 CONCLUSÃO

A estratégia analítica abordada nesse trabalho demonstrou ser simples, rápida de ser aplicada, precisa e exata para a determinação simultânea de cromo e ferro em amostras de suplemento alimentar. A capacidade do método desenvolvido de realizar a análise direta, sem a necessidade do uso de procedimentos complexos de preparo de amostra, reduziu o custo da análise, eliminou o uso de reagentes concentrados e reduziu significativamente a geração de resíduos. A possibilidade de contaminação durante a análise também foi reduzida, devido a uma menor manipulação da amostra.

Para a amostra B, as quantidades de ambos os elementos estavam de acordo com a estabelecida pela ANVISA. Para as amostras C e D, a quantidade de ferro determinada estava de acordo com a legislação, enquanto que a de cromo na amostra D, se mostrou superior aos limites estabelecidos.

Portanto, o método desenvolvido utilizando a técnica de HR-CS GF AAS com amostragem direta de sólidos apresentou resultados satisfatórios, no qual todos os parâmetros de desempenho do método atendem adequadamente aos limites de cromo e ferro estabelecidos pela ANVISA, podendo ser empregado pelo órgão regulador ou fabricantes de suplementos alimentares na verificação da conformidade destes produtos em relação a legislação vigente.

## REFERÊNCIAS

1. CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. **Crescimento do setor de suplemento alimentar pode chegar a 30%**. 2018. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/noticia.php?id=5033>>. Acesso em: 11 nov. 2018.
2. PIRES, Tires. **Pesquisa: Hábitos de consumo de Suplementos Alimentares no Brasil**. International Life Sciences Institute, 2017. Disponível em: <<http://ilsibrasil.org/wp-content/uploads/sites/9/2017/06/Dra.-Tatiana-Pires-ABIAD-Suplementos-Alimentares-Apresentação-TP-no-ILSI-12-06-2017.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2018.
3. SMICHOWSKI, Patricia; LONDONIO, Agustín. The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 113-120, 2018.
4. ROCCO, Anna et al. Miniaturized separation techniques as analytical methods to ensure quality and safety of dietary supplements. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 103, p. 156-183, 2018.
5. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Suplementos alimentares: Documento de base para discussão regulatória**. 2017. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset\\_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/4115412](http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/4115412)>. Acesso em: 3 nov. 2018.
6. VOET, Gijsbert B. van Der et al. Clinical and Analytical Toxicology of Dietary Supplements: A Case Study and a Review of the Literature. **Biological Trace Element Research**, v. 125, p. 1-12, 2008.
7. DOLAN, Scott P. et al. Analysis of Dietary Supplements for Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 51, p. 1307-1312, 2003.
8. HEDEGAARD, Rikke V.; ROKKJÆR, Inge; SLOTH, Jens. Total and inorganic arsenic in dietary supplements based on herbs, other botanicals and algae—a possible contributor to inorganic arsenic exposure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 4429-4435, 2013.
9. RAMAN, Priyadarshini; PATINO, Lina C.; NAIR, Muraleedharan. Evaluation of Metal and Microbial Contamination in Botanical Supplements. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 52, p. 7822-7827, 2004.
10. ALJALOUBR, Sulaiman et al. Microbiological quality and safety of dietary supplements sold in Saudi Arabia. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, p. 593-596, 2013.
11. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC Nº 243**, de 26 de julho de 2018.
12. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa - **IN Nº 28**, de 26 de julho de 2018.
13. O'DELL, Boyd L.; SUNDE, Roger. **Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements**. New York: Marcel Dekker, 1997.
14. INSTITUTE OF MINERAL RESEARCH. **Mineral Elements**. Disponível em: <<https://instituteofmineralresearch.org/mineral-elements/>>. Acesso em 11 nov. 2018.

15. SINGH, Vivek; GARG, A. Availability of essential trace elements in Indian cereals, vegetables and spices using INAA and the contribution of spices to daily dietary intake. **Food Chemistry**, v. 94, p. 81-89, 2006.
16. ANDERSON, Richard. Chromium as an Essential Nutrient for Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. S35-S41, 1997.
17. MULWARE, Stephen Juma. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. **3 Biotech**, v. 3, p. 85-96, 2013.
18. MARTINEZ-NAVARRETE, N. et al. Iron deficiency and iron fortified foods—a review. **Food Research International** v. 35, p. 225-232, 2002.
19. SOETAN, K. O.; OLAIYA, C. O.; OYEWOLE, O. E.. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**, v. 4, p. 200-222, 2010.
20. GREGORY, Allison.; HAYFLICK, Susan. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders Overview. **Gene Reviews**, 1993.
21. UDOUSORO, Imaobong; IKEM, Abua; AKINBO, Olujide. Content and daily intake of essential and potentially toxic elements from dietary supplements marketed in Nigeria. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 62, p. 23-34, 2017.
22. FILIPIAK-SZOK, Anna; KURZAWA, Marzanna; SZŁYK, Edward. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 54-58, 2015.
23. KREJČOVÁ, Anna et al. Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 588-596, 2012.
24. AVULA, Bharathi et al. Inorganic elemental compositions of commercial multivitamin/mineral dietary supplements: Application of collision/reaction cell inductively coupled-mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 127, p. 54-62, 2011.
26. MINDAK, William R. et al. Lead in Women's and Children's Vitamins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6892-6896, 2008.
27. KAUFFMAN, John F. et al. Lead in pharmaceutical products and dietary supplements. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 128-134, 2007.
28. SOLTYK, Krystyna et al. Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 425-432, 2003.
29. MARRERO, Julieta et al. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: Are the concentrations declared in the labels accurate?. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 81-86, 2013.
30. FRENTIU, Tiberiu et al. Analytical capability of a medium power capacitively coupled plasma for the multielemental determination in multimineral/multivitamin preparations by atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2447-2452, 2012.
31. TUMIR, H. et al. Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplements on the Croatian market. **Food Control**, v. 21, p. 885-889, 2010.

32. GARCÍA-RICO, Leticia; LEYVA-PEREZ, Johanna; JARA-MARINI, Martin E.. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1599-1605, 2007.
33. KOVÁCS, R. et al. Investigation of chromium content in foodstuffs and nutrition supplements by GFAAS and determination of changing Cr(III) to Cr(VI) during baking and toasting bread. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1209-1213, 2007.
34. MATTOS, Julio C. P. et al. Influence of citric acid as chemical modifier for lead determination in dietary calcium supplement samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, p. 687-692, 2005.
35. SORIANO, Sílvio; NETTO, Annibal D. Pereira; CASSELLA, Ricardo. Determination of Cu, Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in multivitamin/multimineral dosage forms or tablets after an acidic extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 304-310, 2007.
36. KOWALSKI, Artur; FRANKOWSKI, Marcin. Levels and potential health risks of mercury in prescription, non-prescription medicines and dietary supplements in Poland. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 396-400, 2015.
37. SOUSA, Rafael. A.; CAMPOS, Náira S.; ORLANDO, Ricardo. **Preparação de amostras para análise elementar**. Departamento de Química UFJF, 2015.
38. KRAWCZYK, Magdalena. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 377-384, 2014.
39. KREJCOVA, Anna et al. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction. **Food Chemistry**, v. 98, p. 171-178, 2006.
40. ZACHARIADIS, George A.; OLYMPIOU, Agathi. Use of slurry suspension sample introduction technique in fast multielement analysis of multimineral and multivitamin formulations by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 541-546, 2008.
41. MAJORS, Ronald. Sample Prep Perspectives. **LCGC**, v. 9, p. 16-20, 1991.
42. BU, Kaixuan; CIZDZIEL, James V.; REIDY, Lorlyn. Analysis of herbal supplements for selected dietary minerals and trace elements by laser ablation- and solution-based ICPMS. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 244-249, 2013.
43. RÊGO, Jardes F. et al. Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling. **Talanta**, v. 100, p. 21-26, 2012.
44. WELZ, Bernhard; VALE, Maria Goreti R. **Ewing's Analytical Instrumentation Handbook**. New York: Marcel Dekker, 2005.
45. WELZ, Bernhard et al. **High-Resolution Continuum Source AAS**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
46. WELZ, Bernhard; SPERLING, Michael. **Atomic Absorption Spectrometry**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.
47. DEDINA, Jiri. **Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy**. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2010.
48. BEATY, Richard; KERBER, Jack. **Concepts, Instrumentation and**

- Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry.** The Perkin-Elmer Corporation, 1993.
49. BORGES, Daniel L. G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 1, p. 58-67, 2005.
  50. WELZ, Bernhard et al. Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry: Past, Present and Future Aspects - A Critical Review. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 799-821, 2014.
  51. RESANO, Martín; FLÓREZ, María. R.; GARCÍA-RUIZ, Esperanza. 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.
  52. RESANO, Martín. et al. On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, p. 321-328, 2011.
  53. DITBERT, Ingrid M. et al. Simultaneous determination of cobalt and vanadium in undiluted crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 590-595, 2010.
  54. INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Orientação sobre validação de métodos analíticos, 2011.
  55. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - **RE Nº 899**, de 29 de maio de 2003.
  56. SKOOG, Douglas. A. et al. **Fundamentos da Química Analítica**. São Paulo: Cengage, 2005.
  57. RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
  58. MARTINS, Maria E. G. Coeficiente de correlação amostral. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, p. 34-36, 2014.
  59. HARRIS, Daniel. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC EDITORA, 2001.