

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química



TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A DETERMINAÇÃO
DE METAIS EM SUPLEMENTOS DIETÉTICOS POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS
COM DETECÇÃO CONDUTIMÉTRICA DIRETA**

Rodrigo Mendes Pereira

PELOTAS, RS

2018

Rodrigo Mendes Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A DETERMINAÇÃO
DE METAIS EM SUPLEMENTOS DIETÉTICOS POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS
COM DETECÇÃO CONDUTIMÉTRICA DIRETA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências (área: Química Analítica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko

Co-orientador: Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi

PELOTAS, RS

2018

Rodrigo Mendes Pereira

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
METAIS EM SUPLEMENTOS DIETÉTICOS POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS COM
DETECÇÃO CONDUTIMÉTRICA DIRETA

Tese aprovada, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências,
área de concentração em Química Analítica, pelo Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Pelotas.

17 de agosto de 2018.

Banca examinadora:

.....
Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko (Orientadora/Presidente da Banca)
Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

.....
Prof. Dr. Edson Irineu Müller – UFSM
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

.....
Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel – FURG
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

.....
Prof.^a Dr.^a Carla de Andrade Hartwig – UFPel
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas pela possibilidade da execução deste trabalho.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de doutorado.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko, pela atenciosa e dedicada orientação, assim como por todas as oportunidades, conselhos e discussões que foram muito importantes para minha formação.

Às Professoras Dr.^a Clarissa Marques Moreira dos Santos e Dr.^a Paola de Azevedo Mello pela participação como banca de qualificação e pelas contribuições para o aprimoramento deste trabalho. Aos Professores Dr. Ednei Gilberto Primel e Dr. Edson Irineu Müller pela participação como banca examinadora e pelas valiosas contribuições para este trabalho. À Prof.^a Dr.^a Carla de Andrade Hartiwg pela participação como banca de qualificação e como banca examinadora, bem como pela amizade e ensinamentos.

Aos integrantes do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais da Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, pela oportunidade de realização de alguns experimentos.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais da UFPel, pelo apoio, amizade e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, aos meus colegas, amigos e irmãos Diogo La Rosa Novo, Filipe Soares Rondan, Gilberto da Silva Coelho e Marcelo Guerreiro Crizel por toda a parceria construída durante o período em que tivemos a oportunidade de desenvolver atividades acadêmicas em conjunto.

À Djanira Maciel, secretária do PPGQ, pelo sempre dedicado auxílio.

À minha amiga e companheira Bianca Alves Lehmann pelo carinho, apoio, incentivo, amizade, companhia, compreensão e paciência.

À minha família por toda a compreensão, apoio, incentivo e carinho, e a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram e apoiaram durante essa importante etapa.

“Hi, I'm Dee Dee Ramone, and I'd like to congratulate myself, and thank myself, and give myself a big pat on the back. Thank You Dee Dee, you're very wonderful. I Love you.”

(Dee Dee Ramone)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	SUPLEMENTOS DIETÉTICOS.....	25
3.1.1	Histórico e definição	25
3.1.2	Classificação	26
3.1.3	Regulamentação dos suplementos dietéticos no Brasil e EUA	28
3.1.4	Determinação de metais em suplementos dietéticos	30
3.2	TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS... 45	
3.2.1	Técnicas espectrométricas	45
3.2.2	Cromatografia de íons	48
3.2.2.1	Fundamentos e aplicações em IC.....	50
3.3	PREPARO DE AMOSTRAS.....	57
3.3.1	Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	64
4.2	REAGENTES	66
4.3	PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO	67
4.4	AMOSTRAS	68
4.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS SULFATADAS.....	71
4.6	PREPARO DE AMOSTRAS.....	71

4.6.1	Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)	72
4.6.2	Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)	74
4.7	DETERMINAÇÃO ELEMENTAR	75
4.7.1	Cromatografia de íons: Avaliação da fase móvel para a determinação de metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição	76
4.7.2	Influência da acidez na determinação de metais por IC-DC	77
4.8	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DOS MÉTODOS PROPOSTOS	77
4.9	APLICABILIDADE DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS POR IC-DC	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS SULFATADAS	80
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS POR IC-DC	82
5.2.1	Avaliação da composição, concentração e vazão da fase móvel	82
5.2.2	Influência da acidez na determinação de metais por IC-DC	93
5.3	AVALIAÇÃO DA MIC PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS	95
5.3.1	Suplemento hipercalórico	96
5.3.2	Suplemento multivitamínico/mineral	103
5.3.2.1	Avaliação da extração assistida por radiação micro-ondas	110
5.3.3	Suplemento botânico	111
5.3.4	Resumo dos parâmetros selecionados após a otimização da MIC ...	116
5.4	PARÂMETROS DE MÉRITO DOS MÉTODOS PROPOSTOS	119
5.4.1	Ensaio de recuperação com solução padrão	121
5.4.2	Comparação dos métodos propostos com método de referência	123

5.5	APLICABILIDADE DOS MÉTODOS PROPOSTOS VISANDO À DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SUPLEMENTOS DIETÉTICOS	126
5.6	RESÍDUOS GERADOS E DESTINO FINAL	131
6	CONCLUSÕES	132
	REFERÊNCIAS	134
	ANEXOS	148

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Descrição de um sistema compacto de cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta.51
- Figura 2.** Sistema comercial utilizado para a decomposição de amostras por MIC sendo demonstrado a combustão de uma amostra e o refluxo da solução absorvedora promovido pelo aquecimento com micro-ondas (adaptado de Microwave Reaction System for Sample Preparation, Anton Paar. Disponível em: <<http://www.anton-paar.com>>).62
- Figura 3.** Sistema utilizado para o preparo das amostras de suplementos dietéticos: A) Forno de micro-ondas Multiwave 3000®; B) rotor equipado com oito frascos; C) frasco de quartzo e dispositivo de quartzo para MIC (adaptado de Microwave Reaction System: Multiwave 3000®, Anton Paar. Disponível em: <<http://www.anton-paar.com>>).65
- Figura 4.** Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de suplemento hipercalórico, botânico e multivitamínico/mineral por MIC para a subsequente determinação metais por IC-DC.73
- Figura 5.** Cromatograma obtido para padrão multielementar contendo: 1) Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2) Na^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 3) NH_4^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 4) K^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 5) Mn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 6) Mg^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e 7) Ca^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) em água usando uma mistura de HNO_3 ($1,7 \text{ mmol L}^{-1}$) e DPA ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$) como fase móvel....83
- Figura 6.** Tempos de retenção de cátions de metais alcalinos, alcalinos terrosos, de transição e do íon NH_4^+ a partir do uso de concentrações crescentes de: **A)** ácido cítrico ($4,0$ a $12,0 \text{ mmol L}^{-1}$); **B)** ácido tartárico ($2,0$ a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) ou **C)** ácido oxálico ($0,5$ a $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como fase móvel.85
- Figura 7.** Cromatograma obtido para padrão multielementar contendo: 1) Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2) Na^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 3) NH_4^+ ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$); 4) Zn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 5) Co^{2+} ($1,5$

mg L⁻¹); 6) K⁺ (2,5 mg L⁻¹); 7) Mn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); 8) Mg²⁺ (1,5 mg L⁻¹) e 9) Ca²⁺ (2,5 mg L⁻¹) em água, usando ácido oxálico 2,7 mmol L⁻¹ como fase móvel.
.....88

Figura 8. Influência do uso de acetonitrila como modificador químico na fase móvel (ácido oxálico 2,7 mmol L⁻¹). Cromatogramas obtidos para padrão multielementar contendo: 1) Li⁺ (0,5 mg L⁻¹); 2) Na⁺ (5,0 mg L⁻¹); 3) NH₄⁺ (0,1 mg L⁻¹); 4) Zn²⁺ (2,5 mg L⁻¹); 5) Co²⁺ (2,5 mg L⁻¹); 6) K⁺ (5,0 mg L⁻¹); 7) Mn²⁺ (2,5 mg L⁻¹); 8) Mg²⁺ (2,5 mg L⁻¹) e 9) Ca²⁺ (5,0 mg L⁻¹) em água.90

Figura 9. Cromatograma obtido para padrão multielementar contendo: 1) Li⁺ (0,5 mg L⁻¹); 2) Zn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); 3) Na⁺ (1,0 mg L⁻¹); 4) Co²⁺ (1,5 mg L⁻¹); 5) K⁺ (1,0 mg L⁻¹); 6) Mn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); 7) Mg²⁺ (1,0 mg L⁻¹) e 8) Ca²⁺ (1,0 mg L⁻¹) em água, usando as condições cromatográficas selecionadas.93

Figura 10. Influência da acidez na determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição por IC-DC (n=3).94

Figura 11. Aspecto das soluções obtidas e dos suportes após a digestão de massas crescentes de suplemento hipercalórico (400 a 900 mg) por MIC usando 25 bar de pressão de O₂, HNO₃ 1 mol L⁻¹ como solução absorvedora e 5 min de refluxo a 1400W.97

Figura 12. Pressão máxima atingida no sistema para diferentes pressões iniciais de oxigênio utilizadas na decomposição de 700 mg de suplemento hipercalórico (n=3).99

Figura 13. Influência da concentração de HNO₃ na absorção de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ e Na⁺ após a decomposição de 700 mg de suplemento hipercalórico por MIC, usando 25 bar de pressão de O₂ e 5 min de tempo de refluxo a 1400W (n=3).
..... 100

- Figura 14.** Influência da concentração de HNO₃ e HCl na absorção de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ e Na⁺ após a decomposição de 700 mg de suplemento hipercalórico por MIC, usando 25 bar de pressão de O₂ e 5 min de refluxo a 1400W (n=3)..... 102
- Figura 15.** Aspecto das soluções obtidas e dos suportes após a digestão de massas crescentes de suplemento multivitamínico/mineral (600 a 1100 mg) por MIC usando 25 bar de pressão de O₂, HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W..... 105
- Figura 16.** Aspecto das soluções obtidas após a decomposição de 600 mg de suplemento multivitamínico/mineral usando 25 bar de pressão de O₂, 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W com o resíduo no suporte **(A)** ou em contato com a solução absorvedora **(B)**. 107
- Figura 17.** Influência do aumento da massa de amostra nas concentrações dos analitos quantificados por IC-DC após a decomposição de suplemento multivitamínico/mineral por MIC usando 25 bar de pressão de O₂, 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 10 min de tempo de refluxo a 1400 W. 108
- Figura 18.** Influência do tempo de refluxo nas concentrações dos analitos quantificados por IC-DC após a decomposição de 1000 mg de suplemento multivitamínico/mineral por MIC usando 25 bar de pressão de O₂ e 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora (n=3)..... 109
- Figura 19.** Aspecto das soluções obtidas e dos suportes após a digestão de massas crescentes de suplemento botânico (600 a 1100 mg) por MIC usando 25 bar de pressão de O₂, HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W..... 113
- Figura 20.** Aspecto das soluções resultantes da decomposição de 1000 mg **(A)** ou 1100 mg **(B)** usando 25 bar de pressão de O₂, HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como

solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W com o resíduo em contato com a solução absorvedora..... 114

Figura 21. Influência do tempo de refluxo nas concentrações dos analitos quantificados por IC-DC após a decomposição de 1000 mg de suplemento botânico por MIC usando 25 bar de pressão de O₂ e 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora (n=3)..... 115

Figura 22. Cromatogramas obtidos a partir da análise das soluções resultantes do preparo das amostras de suplementos dietéticos pelos métodos propostos, de um branco analítico do procedimento e de um padrão multielementar contendo: 1) Li⁺ (0,5 mg L⁻¹); 2) Zn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); 3) Na⁺ (1,0 mg L⁻¹); 4) Co²⁺ (1,5 mg L⁻¹); 5) K⁺ (1,0 mg L⁻¹); 6) Mn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); 7) Mg²⁺ (1,0 mg L⁻¹) e 8) Ca²⁺ (1,0 mg L⁻¹) em água, usando as condições cromatográficas selecionadas. 118

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características analíticas das técnicas instrumentais mais utilizadas para a determinação de metais em suplementos dietéticos. Adaptado de Barin (2007).46
- Tabela 2.** Parâmetros operacionais para a determinação elementar por ICP OES. ...75
- Tabela 3.** Teor de cinzas sulfatadas em amostras de suplemento hipercalórico, botânico e multivitamínico/mineral (média \pm desvio padrão, n = 3).80
- Tabela 4.** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir da análise de um padrão multielementar contendo: Li⁺ (0,5 mg L⁻¹); Zn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); Na⁺ (1,0 mg L⁻¹); Co²⁺ (1,5 mg L⁻¹); K⁺ (1,0 mg L⁻¹); Mn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); Mg²⁺ (1,0 mg L⁻¹) e Ca²⁺ (1,0 mg L⁻¹) em água (n=9).92
- Tabela 5.** Concentrações das espécies quantificadas por IC-DC quando 600 mg de suplemento multivitamínico/mineral foram decompostos por MIC usando 25 bar de pressão de O₂, 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W com o resíduo no suporte ou em solução (média \pm desvio padrão, n=3). 106
- Tabela 6.** Comparação das concentrações de Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺ e Zn²⁺ determinadas por IC-DC após preparo da amostra por MW-AE ou MIC (média \pm desvio padrão, n=3).....111
- Tabela 7.** Parâmetros selecionados após a otimização da MIC para o preparo de amostras suplementos hipercalóricos (SHP), suplementos multivitamínicos/minerais (SMVM) e suplementos botânicos (SB) visando à subsequente determinação de Ca²⁺, Co²⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺ e Zn²⁺ por IC-DC.117

- Tabela 8.** Faixa linear de trabalho e coeficientes de determinação das curvas analíticas utilizadas para a determinação dos analitos por IC-DC. Limites de detecção e quantificação dos métodos propostos para a determinação de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} por IC-DC em suplementos hipercalóricos (SHP), suplementos multivitamínicos e/ou minerais (SMVM) e suplementos botânicos (SB) (n=10). 120
- Tabela 9.** Recuperações para Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} após decomposição de suplemento hipercalórico (SHP), suplemento multivitamínico/mineral (SMVM) e suplemento botânico (SB) por MIC utilizando as condições previamente selecionadas e subsequente determinação por IC-DC (média \pm desvio, %, n=3). 122
- Tabela 10.** Resultados obtidos após decomposição de suplemento hipercalórico (SHP), multivitamínico/mineral (SMVM) e botânico (SB) por MIC utilizando as condições previamente selecionadas e subsequente determinação por IC-DC, com os obtidos pelo método de referência (MW-AD e ICP OES) (média \pm desvio padrão, mg kg^{-1} , n = 3). 124
- Tabela 11.** Principais características dos métodos propostos e do método de referência para a determinação de metais em suplementos dietéticos. 125
- Tabela 12.** Concentrações de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} em suplementos hipercalóricos de variadas marcas obtidas após a digestão das amostras por MIC e determinação por IC-DC (média \pm desvio padrão, mg kg^{-1} , n = 3).. 128
- Tabela 13.** Concentrações de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} em suplementos multivitamínicos/minerais e de suplementos botânicos de variadas marcas obtidas após a digestão das amostras por MIC e determinação por IC-DC (média \pm desvio padrão, mg kg^{-1} , n = 3). 129
- Tabela 14.** Valores informados para Ca, Mg, Mn, Na e Zn pelos fabricantes de alguns dos suplementos dietéticos analisados. 149

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Métodos analíticos aplicados para a determinação de metais em suplementos dietéticos.....32
- Quadro 2.** Resumo das amostras adquiridas e respectivos ingredientes informados nos rótulos dos produtos.....69

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS – espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASV – voltametria de redissolução anódica, do inglês *anodic stripping voltammetry*
- CRM – material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
- CVAAS – espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio, do inglês *cold vapor atomic absorption spectrometry*
- DPA – ácido dipicolínico, do inglês *dipicolinic acid*
- ETAAS – espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês *electrothermal atomic absorption spectrometry*
- FAAS – espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*
- FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drug Administration*
- GF AAS – espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*
- HG AAS – espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *hydride generation atomic absorption spectrometry*
- HR-CS AAS – espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, do inglês *high-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry*
- HR-CS-GF AAS – espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite, do inglês *high resolution-continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*
- IC – cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*
- IC-DC – cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta, do inglês *ion chromatography with direct conductivity detection*
- ICP OES – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
- ICP-MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

IDR – Ingestão diária recomendada

INAA – análise por ativação com nêutrons instrumental, do inglês *instrumental neutron activation analysis*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LA-ICP-MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com ablação por laser, do inglês *laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*

LIBS – espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser, do inglês *laser-induced breakdown spectroscopy*

LOD – limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ – limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

MIC – combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave-induced combustion*

MW-AD – digestão assistida por radiação micro-ondas, do inglês *microwave-assisted digestion*

MW-AE – extração assistida por radiação micro-ondas, do inglês *microwave-assisted extraction*

MW-O₂ – digestão assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio, do inglês *microwave-assisted digestion under oxygen pressure*

MW-UV – digestão assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, do inglês *microwave-assisted UV-digestion*

NAA – análise por ativação neutrônica, do inglês *neutron activation analysis*

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação

PGAA – análise por ativação com nêutrons com detecção por raios gama prontos, do inglês *prompt gamma activation analysis*

RSD – desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

SB – suplemento botânico

SHP – suplemento hipercalórico

SMVM – suplemento multivitamínico e/ou mineral

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

WADA – Agência Mundial Antidoping, do inglês *World Anti-Doping Agency*

RESUMO

PEREIRA, Rodrigo Mendes. **Desenvolvimento de métodos alternativos para a determinação de metais em suplementos dietéticos por cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta**. 2018. 149f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Química, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Neste trabalho, a combustão iniciada por micro-onda (MIC) foi avaliada para o preparo de amostras de suplementos dietéticos (suplementos hipercalóricos, multivitamínicos e/ou minerais, e botânicos) visando a posterior determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição por cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta (IC-DC). Para isso, fez-se necessária a otimização das condições cromatográficas com o intuito de possibilitar a adequada separação dessas espécies a partir de uma coluna de troca catiônica com grupos carboxila suportados em sílica gel. Os melhores resultados foram obtidos a partir do uso de uma solução de ácido oxálico na concentração de $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila 15% (v/v) como fase móvel e vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Com essas condições foi possível a separação de 8 espécies (Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+}) em menos de 15 minutos. A influência da acidez residual na determinação dos analitos por IC-DC foi estudada e, a partir disso, constatou-se que soluções com acidez residual acima de 15 mmol L^{-1} podem inviabilizar a determinação dos analitos. Assim, como alternativa ao uso de ácidos concentrados no preparo de amostras, a MIC foi avaliada e parâmetros como a massa de amostra, a pressão inicial de O_2 , a solução absorvedora e o tempo de refluxo foram estudados. Em suma, a MIC possibilitou o adequado preparo de elevadas massas de amostra (de até 1 g) e o uso de ácidos diluídos ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$ 1:1 mol L^{-1}), o que permitiu a obtenção de soluções resultantes compatíveis com a determinação por IC-DC. Para a avaliação da exatidão, ensaios de recuperação com solução padrão foram realizados e as recuperações variaram de 91% a 107% para todos os analitos, nas três matrizes avaliadas. Além disso, um método de referência foi reproduzido para a comparação dos resultados, e as concentrações obtidas não diferiram estatisticamente das concentrações determinadas pelos métodos propostos. Os limites de detecção (de 20 até 154 mg kg^{-1}) e quantificação (de 38 até 250 mg kg^{-1}), bem como a precisão dos métodos propostos (desvio padrão relativo $\leq 7\%$) foram considerados satisfatórios. É importante destacar que uso de ácido diluídos promoveu a redução do manuseio de reagentes concentrados, assim como da geração e da periculosidade dos resíduos gerados. Ademais, foi possível realizar a determinação dos analitos com uma técnica que apresenta relativo baixo custo de aquisição e manutenção, e capacidade de determinação multielementar sequencial. Com relação a aplicabilidade dos métodos propostos, destacam-se as discrepâncias observadas entre os valores determinados e informados pelos fabricantes, os quais estão, possivelmente, relacionados ao uso de métodos analíticos inadequados para o controle de qualidade desses produtos.

Palavras-chave: suplementos dietéticos; preparo de amostras; ácidos diluídos; cromatografia de íons, análise multielementar; determinação sequencial de metais.

ABSTRACT

PEREIRA, Rodrigo Mendes. **Development of alternative methods for determination of metals in dietary supplements by ion chromatography with direct conductivity detection**. 2018. 149f. Thesis (Doctoral in Chemistry) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Química, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

In this work, microwave-induced combustion (MIC) was evaluated for sample preparation of dietary supplements (hypercaloric, multivitamin and/or mineral and botanical supplements) for further alkali, alkaline-earth and transition metals determination by ion chromatography with direct conductivity detection (IC-DC). For this, it was required the chromatographic parameters optimization in order to provide the suitable separation of these species from a cation exchange column with carboxyl groups supported on silica gel. The most suitable results were obtained using 2.7 mmol L^{-1} oxalic acid in 15% (v/v) acetonitrile as mobile phase and using 0.7 mL min^{-1} as flow rate. Separation of 8 species (Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ and Zn^{2+}) was possible in less than 15 minutes. The maximum residual acidity that allows a suitable determination of all analytes by IC-DC was also evaluated, and it was possible to observe that final digests with residual acidity above 15 mmol L^{-1} can make impossible the determination of the analytes by IC-DC. Thus, as an alternative to the use of concentrated acids on the sample preparation step, the MIC was evaluated and some parameters such as sample mass, oxygen pressure, absorbing solution and reflux time were studied. In short, the MIC enabled the adequate preparation of high sample masses (up to 1 g) and the use of diluted acids (HNO_3 : HCl 1: 1 mol L^{-1}), allowing to obtain digests fully compatible with IC-DC determination. Accuracy was evaluated by recovery tests using standard solution, and recoveries ranged from 91% to 107% for all analytes in the three matrices evaluated. A reference method was also performed for comparison of the results with those obtained using proposed methods, and statistical differences were not found. Proposed methods presented suitable limits of detection (from 20 to 154 mg kg^{-1}) and quantification (from 38 to 250 mg kg^{-1}), as well as suitable precision (relative standard deviations $\leq 7\%$). It is important to highlight that the use of diluted acids on the sample preparation promoted the reduction of the handling of concentrated reagents, as well as the generation and hazardousness of waste. In addition, it was possible to carry out the analytes determination using a technique that presents relatively low acquisition and maintenance costs, and sequential multielemental determination capability. Regarding to applicability of the proposed methods, stands out the discrepancies observed between the determined values and the informed values by manufactures, which are possibly related to the use of unsuitable analytical methods for quality control of these products.

Keywords: dietary supplements; sample preparation; diluted acids; ion chromatography; multi-elemental analysis; sequential determination of metals.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de suplementos dietéticos na prevenção e tratamento da deficiência nutricional, bem como para a manutenção e/ou promoção de qualidade de vida, é uma prática que tem se tornado cada vez mais comum na atual sociedade (WILDMAN *et al.*, 2006; WATSON, 2015). Isso se deve, em parte, ao impacto de modelos publicitários nos valores e atitudes da população no que tange a sua própria alimentação, assim como a supervalorização da imagem corporal a partir de um padrão estético considerado ideal (CARRO, 2007; SOUZA *et al.*, 2014). Além disso, os suplementos dietéticos são facilmente adquiridos sem qualquer restrição em farmácias, supermercados, lojas especializadas em produtos dietéticos, lojas virtuais, entre outras, o que contribui para o consumo abusivo desses produtos.

Esses produtos são classificados de acordo com a sua composição nutricional e, geralmente, contêm ingredientes combinados ou isolados, que incluem vitaminas, minerais (macroelementos, microelementos e elementos traço), proteínas, carboidratos, aminoácidos, fibras, ácidos graxos, ervas e extratos, probióticos, enzimas, carotenoides, fitoesteróis, entre outros (DOLAN *et al.*, 2003; GARCÍA-RICO *et al.*, 2007). Nesse sentido, tendo em vista a grande variedade de suplementos dietéticos comercializados, bem como o notável crescimento no consumo desses produtos, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam garantir a segurança alimentar, principalmente, no que diz respeito a concentração dos nutrientes informados nos rótulos. Importante salientar que essas informações são extremamente relevantes, pois concentrações inadequadas de nutrientes, como os minerais, podem tornar o produto ineficiente para a finalidade proposta e até mesmo provocar danos à saúde devido a ingestão excessiva, como demonstrado em outros estudos (TOLONEN, 1990; BOGDEN; KLEVAY, 2000; BLAKE, 2007; WATSON, 2015).

Dentre os minerais contidos nos suplementos dietéticos, os metais merecem destaque, pois são de vital importância para o nosso organismo, uma vez que atuam em diversos mecanismos biológicos de síntese, transporte, ativação, reparo, auto regulação, entre outros (DISILVESTRO, 2004; BLAKE, 2007; WEBB, 2014). Além disso, existem diversos estudos que relacionam a deficiência e/ou excesso de alguns metais a doenças

cardíacas, endócrinas, ósseas, renais, dentre outras (BOGDEN; KLEVAY, 2000; WATSON, 2015). Vale destacar que os metais são adicionados nos suplementos dietéticos na forma de sais e que erros no doseamento, bem como contaminação oriunda da matéria-prima e do processo utilizado em sua produção, podem acarretar em concentrações distintas das que são informadas. Assim, é evidente a importância do controle adequado da concentração desses elementos em suplementos dietéticos.

A determinação de metais em suplementos dietéticos abrange diversas abordagens analíticas, no entanto, na maioria dos casos é necessária a conversão da amostra em uma solução compatível à técnica de determinação – exceto quando utilizam-se técnicas que permitem a análise direta de sólidos (KHUDER *et al.*, 2009; BU *et al.*, 2013; WAHEED *et al.*, 2014). Por sua vez, o preparo de amostras de suplementos dietéticos visando à determinação de metais se baseia, geralmente, em métodos de digestão úmida em sistemas abertos ou fechados com aquecimento convencional ou micro-ondas na presença de ácidos inorgânicos concentrados (AVULA *et al.*, 2011; MARRERO *et al.*, 2013; TOKALIOĞLU *et al.*, 2014). As técnicas espectrométricas, como a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS) ou forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) são as mais utilizadas para a determinação de metais em suplementos dietéticos (CHUANG *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2001; KRAWCZYK, 2014). Apesar dessas técnicas geralmente apresentarem sensibilidade, assim como precisão e exatidão adequadas para a determinação de metais em suplementos dietéticos, elas são susceptíveis a interferências espectrais e não espectrais e, em alguns casos, são inadequadas (ZENG *et al.*, 2006; MICHALSKI, 2009). Além disso, os equipamentos de absorção atômica são, geralmente, monoelementares, o que torna a análise bastante morosa e demorada quando o intuito é o controle da concentração de metais nesses produtos. Por outro lado, as técnicas com plasma indutivamente acoplado, embora sejam mais sensíveis e possibilitem a determinação multielementar, são ainda mais susceptíveis a interferências, principalmente as relacionadas ao ineficiente preparo da amostra (SARZANINI; MENTASTI, 1997). Outro fator que dificulta o uso dessas técnicas na análise de rotina está relacionado ao elevado custo de aquisição e manutenção.

Nesse contexto, a cromatografia de íons com detecção por condutividade (IC-DC) pode ser uma alternativa para a determinação multielementar sequencial de metais em suplementos dietéticos, uma vez que apresenta algumas vantagens frente as técnicas espectrométricas, como relativo baixo custo de aquisição e manutenção, possibilidade de automação e a necessidade de reduzido volume de amostra para análise (500 a 2000 μL) (ZENG *et al.*, 2006; MICHALSKI, 2009). Apesar disso, a IC-DC é extremamente dependente da força iônica, ou seja, soluções com elevadas concentrações de íons são inadequadas para a análise, pois saturam facilmente os sítios ativos de troca iônica da coluna cromatográfica. Portanto, soluções resultantes de métodos de preparo de amostras que utilizam ácidos concentrados não são adequadas para análise por IC-DC (FRITZ; GJERDE, 2009; MICHALSKI, 2009).

Nesse sentido, é necessário o uso de métodos de preparo de amostras alternativos, os quais possibilitem o uso de soluções diluídas, assim como a decomposição de elevadas massas de amostras, com o intuito de suprir as limitações da IC-DC relacionadas a moderada sensibilidade para alguns metais. Sob esse aspecto, destaca-se o sistema de combustão iniciada por micro-ondas (MIC), o qual já foi aplicado ao preparo de amostras de diversas matrizes visando a posterior determinação de metais, metaloides e não metais (BARIN *et al.*, 2014). Apesar disso, ainda não foi avaliada para o preparo de amostras visando a determinação de metais por IC-DC. Importante mencionar que o uso de soluções diluídas no preparo de amostras, além de tornar os digeridos compatíveis com as técnicas de determinação, reduz os riscos de acidentes, a exposição do analista, o consumo de energia e reagentes, bem como a geração de resíduos.

Diante do exposto, percebe-se a importância da determinação de metais em suplementos dietéticos, bem como a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos que proporcionem a exata e precisa quantificação desses elementos e, também, que atendam aos preceitos da Química Analítica Verde. Nesse sentido, o uso da MIC, ou de outros métodos de preparo de amostras que possibilitem o uso de ácidos diluídos associado a determinação dos analitos por IC-DC, apresenta grande potencial para o adequado controle da concentração de metais em suplementos dietéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos alternativos para a determinação de metais em suplementos dietéticos, os quais possibilitem o uso de ácidos diluídos durante o preparo de amostras e de técnicas analíticas com custo de aquisição e manutenção mais acessíveis. Nesse sentido, pretende-se avaliar a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) para o preparo de amostras de suplementos dietéticos (hipercalóricos, multivitamínicos e/ou minerais e botânicos) visando à posterior determinação de metais alcalinos (K, Li e Na), alcalinos terrosos (Ca e Mg) e de transição (Co, Cu, Fe, Mn e Zn) por IC-DC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar parâmetros instrumentais relativos à determinação de metais por cromatografia de íons, como a composição e a concentração da fase móvel, o uso de modificadores químicos na fase móvel e a vazão da fase móvel, visando reduzir o tempo de análise, aumentar a sensibilidade, melhorar a separação dos analitos e, conseqüentemente, a seletividade do método e a resolução dos picos cromatográficos;
- Otimizar parâmetros instrumentais relativos ao preparo de amostras de suplementos dietéticos (hipercalóricos, vitamínicos e/ou minerais, botânicos, a base de óleos, dentre outros) por MIC, como a massa de amostra, o tipo e a concentração solução absorvedora e o programa de irradiação com micro-ondas no que tange a etapa de refluxo, com o intuito de possibilitar uma eficiente decomposição da amostra utilizando apenas soluções diluídas. Com isso, pretende-se elevar os limites de detecção do método e fornecer soluções adequadas a determinação por IC-DC;

- Avaliar a exatidão do(s) método(s) proposto(s) através da realização de ensaios de recuperação com solução padrão em diferentes níveis de concentração. Além disso, pretende-se reproduzir pelo menos um método de referência descrito na literatura para a comparação dos resultados;
- Aplicar o(s) método(s) desenvolvido(s) para a análise de suplementos dietéticos (hipercalóricos, multivitamínicos e/ou minerais e botânicos) e avaliar se as informações contidas nos rótulos dos produtos avaliados são concordantes com as obtidas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

3.1.1 Histórico e definição

Existem indícios de que o conceito de suplementos dietéticos tenha tido origem no início da civilização, entre os anos 4000 e 1950 a.C., quando os sumérios acreditavam que o consumo de alguns frutos, folhas e sementes poderiam satisfazer suas necessidades calóricas (FLANDRIN; MONTANARI, 1996). Por volta dos anos 500 a.C. na Grécia antiga, supunha-se que o consumo desses produtos, além de benéficos para a saúde das pessoas, poderiam conferir habilidades especiais, como força e velocidade (MAYER; BULLEN, 1960; APPLGATE; GRIVETTI, 1997). Posteriormente, atletas Gregos e Romanos implementaram dietas basicamente vegetarianas contendo vegetais, legumes, frutas, cereais e vinho diluído em água (SIMOPOULOS, 1989; GRANDJEAN, 1997).

Em vista desses acontecimentos, diversos atletas empenharam-se em melhorar seus desempenhos a partir de alterações dietéticas no decorrer dos anos. Simultaneamente, o uso de ervas pelos orientais tornou-se uma prática muito comum para melhorar a qualidade de vida das pessoas (DAMODARAN *et al.*, 2008). Desde então, o conhecimento sobre nutrição e fisiologia cresceu de maneira expressiva no mundo, e com isso, novas abordagens nutricionais foram desenvolvidas visando melhorar o rendimento de atletas, bem como a qualidade de vida de pessoas de diferentes faixas etárias e estilos de vida. Sabe-se que muitos alimentos de origem vegetal e animal são ricos em nutrientes como vitaminas, minerais, carboidratos, proteínas, entre outros, os quais são essenciais para o funcionamento adequado do metabolismo humano (NEPA, 2011). No entanto, mesmo com o amplo conhecimento sobre a composição dos alimentos, é praticamente inviável suprir as necessidades

nutricionais e promover os efeitos desejados em indivíduos com deficiências e/ou indivíduos que não apresentam uma rotina alimentar adequada (MASON, 2007).

A evolução do conhecimento científico quanto a composição dos alimentos e das necessidades nutricionais do ser humano tornou possível o desenvolvimento de produtos dietéticos para a complementação da dieta de indivíduos com necessidades adicionais de nutrientes. Esses produtos, denominados de suplementos dietéticos têm sido amplamente utilizados nas últimas décadas para amenizar os problemas relacionados a deficiência nutricional.

Apesar das divergências com relação a definição de suplementos dietéticos, diversos autores os definem como produtos que contêm um ou mais ingredientes dietéticos – como minerais, vitaminas, proteínas, carboidratos, fibras, ácidos graxos, aminoácidos, ervas e extratos, probióticos, enzimas, carotenoides, fitoesteróis, entre outros – e que são utilizados para suprir deficiências nutritivas e contribuir para uma adequada nutrição (HIGHT *et al.*, 1993; HATHCOCK, 2001; DOLAN *et al.*, 2003; SANDER *et al.*, 2006; GARCÍA-RICO *et al.*, 2007; MASON, 2007; CORDÁS; KACHANI, 2010; PRAVST, 2014). São comercializados sempre como doses, na forma sólida (como cápsulas, comprimidos, drágeas, tabletes, granulados, pastilhas mastigáveis), líquida (como aerossóis e suspensões) e semi-sólida (como géis). Os suplementos dietéticos também são conhecidos como suplementos nutricionais ou, ainda, como suplementos alimentares (MASON, 2007; DAMODARAN *et al.*, 2008).

3.1.2 Classificação

Tendo em vista a imensa quantidade de suplementos dietéticos disponíveis no mercado atualmente, é praticamente impossível adotar uma classificação universal acerca dos diferentes tipos de produtos encontrados. Nesse sentido, é possível observar diversas classificações na literatura, as quais são realizadas levando em consideração diferentes parâmetros. Maughan (1999), por exemplo, classifica os ingredientes que compõem os suplementos dietéticos em quatro categorias de acordo com a função que

desempenham em nosso organismo: 1) substâncias que influenciam no metabolismo energético (caféina, carnitina, creatina, dentre outras); 2) substâncias que auxiliam no ganho de massa muscular (proteínas, aminoácidos essenciais, dentre outras); 3) substâncias com alegação de proporcionar benefícios a saúde (aminoácido glutamina, minerais antioxidantes como selênio e zinco, vitaminas com eficácia comprovada, dentre outras) e 4) outras substâncias que ainda não apresentam eficácia reconhecida (ginseng, pólen de abelha, alguns minerais e vitaminas, dentre outras).

Por outro lado, Mason (2007) utiliza uma classificação mais ampla, de acordo com os ingredientes utilizados, dentre os quais citam-se:

- 1) Vitaminas e minerais;
 - a. Multivitaminas e minerais – geralmente contêm 100 % da ingestão diária recomendada (IDR) para vitaminas e quantidades variáveis de minerais e elementos em nível traço;
 - b. Minerais e vitaminas isoladas – podem conter elevadas quantidades do mineral ou vitaminas e, quando excede dez vezes a IDR, são frequentemente chamados de “megadoses”;
 - c. Combinação de vitaminas e minerais – são comercializados para grupos populacionais específicos como, por exemplo, atletas, crianças, mulheres grávidas; pessoas visando a perda peso, adolescentes, vegetarianos, etc.;
 - d. Combinação de vitaminas e minerais com outras substâncias como, por exemplo, óleo de primula e *Panax ginseng*.
- 2) Vitaminas e minerais que ainda não apresentam eficácia reconhecida como, por exemplo, inositol, colina, boro, silício, cobalto, lítio, dentre outros;
- 3) Óleos naturais contendo ácidos graxos com alguma evidência de efeitos benéficos à saúde como, por exemplo, óleo de primula, óleos de peixe, entre outros;
- 4) Substâncias naturais que não apresentam composição e efeitos bem definidos, mas que são comercializadas devido suas “propriedades medicinais” como, por exemplo, algas verdes do gênero *chlorella*, geleia real, microalgas do gênero *spirulina*, dentre outras;

Hathcock (2001) e Pravst (2014), por sua vez, classificam essas substâncias em três categorias, de acordo com a função dietética ou origem: 1) substâncias com funções

nutricionais estabelecidas, como vitaminas, minerais, aminoácidos e ácidos graxos; 2) produtos botânicos (incluindo extratos e concentrados) e 3) outras substâncias com uma ampla variedade de origens e funções fisiológicas, como o piruvato, os precursores de esteroides e o sulfato de condroitina.

Cabe salientar que as classificações apresentadas apenas descrevem categorias dos ingredientes majoritários que podem estar contidos nos suplementos dietéticos, não existindo uma classificação oficial quanto aos tipos de suplementos dietéticos existentes – com exceção das classificações utilizadas em alguns países na regulamentação desses produtos. Além disso, o crescente surgimento de novos produtos contendo substâncias ainda não reconhecidas contribui consideravelmente para que isso ocorra. Portanto, a classificação das amostras de suplementos dietéticos utilizadas neste trabalho será realizada de acordo com a composição de cada produto, uma vez que o desempenho dos métodos analíticos irá depender, em parte, desse parâmetro.

3.1.3 Regulamentação dos suplementos dietéticos no Brasil e EUA

Em vista da diversidade de suplementos dietéticos existentes atualmente no mercado brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em julho de 2018 um novo marco regulatório constituído de seis normas:

1. Resolução RDC 239/2018 – que estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares (ANVISA, 2018a);
2. Resolução RDC 240/2018 – que descreve as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário (ANVISA, 2018b);
3. Resolução RDC 241/2018 – que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos (ANVISA, 2018c);

4. Resolução RDC 242/2018 – que regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como medicamentos específicos (ANVISA, 2018d);
5. Resolução RDC 243/2018 – que dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares (ANVISA, 2018e);
6. Instrução Normativa 28/2018 – Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares (ANVISA, 2018f).

O objetivo dessa ação é melhorar o acesso dos consumidores brasileiros a produtos seguros e de qualidade, reduzir a veiculação de alegações sem comprovação científica e, também, diminuir os obstáculos para a comercialização e inovação desse setor. De acordo com a nova legislação todos os produtos apresentados em formas farmacêuticas e destinados a suplementar a alimentação de pessoas saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos deverão ser enquadrados como suplementos alimentares e atender regras específicas de composição e de rotulagem (ANVISA, 2018e). Ou seja, esses produtos são classificados como alimentos e são isentos de registro sanitário. Existem algumas exceções que devem ser mencionadas como, por exemplo, os suplementos dietéticos que apresentam substâncias estimulantes, hormônios ou outras substâncias consideradas como *doping* na lista de substâncias proibidas pela *World Anti-Doping Agency* (WADA) e na legislação pertinente, assim como substâncias com ação terapêutica ou medicamentosa. Adicionalmente, visando a segurança do consumidor, qualquer suplemento com dosagem de nutrientes, como as vitaminas e/ou minerais, acima de 100% da IDR também não é legislado por esse novo marco regulatório, uma vez que, de acordo com a legislação brasileira, em ambos os casos os produtos são considerados como medicamentos. Assim, esses produtos só podem ser comercializados após avaliação de segurança quanto ao uso – realizada pela ANVISA – e diante da apresentação de prescrição médica (BIESEK *et al.*, 2015). Nesse sentido, produtos à base de vitaminas e/ou minerais, por exemplo, podem ser suplementos ou medicamentos, de acordo com a concentração desses nutrientes.

Nos EUA esses produtos são regulados pela *Food and Drug Administration* (FDA) de maneira similar ao que ocorre atualmente no Brasil, ou seja, através de uma única

resolução que engloba todos os produtos de uso oral que contém um ou mais ingredientes dietéticos como, por exemplo, vitaminas, minerais, ervas ou outras substâncias botânicas, aminoácidos e derivados, extratos, óleos, dentre outras. De acordo com a FDA, os suplementos dietéticos são alimentos e, portanto, não necessitam de aprovação prévia e/ou de registro junto a qualquer órgão de fiscalização para a liberação no mercado. Além disso, as empresas/indústrias não precisam fornecer evidências sobre a segurança e eficácia de seu produto. Segundo a FDA, são as empresas/indústrias os únicos responsáveis pelo controle de qualidade de seus produtos. Apesar disso, suplementos dietéticos contendo novos ingredientes dietéticos são exceções frente a essa regra, uma vez que necessitam de uma avaliação prévia que demonstre que o novo ingrediente é considerado seguro para comercialização (FDA, 2018). São esses parâmetros regulatórios que impulsionaram o mercado americano de suplementos, deixando, contudo, a população exposta a produtos que podem não apresentar segurança e qualidade, como pode ser observado em vista das inúmeras evidências científicas publicadas na literatura, assim como alertas sanitários emitidos pelo FDA e outras agências regulatórias pelo mundo (WHEATLEY; SPINK, 2013).

3.1.4 Determinação de metais em suplementos dietéticos

Diversas substâncias indesejadas podem ser agregadas aos suplementos dietéticos através dos processos de produção, assim como da matéria-prima utilizada. Além disso, existe a preocupação com relação ao adequado doseamento de minerais, vitaminas, dentre outras substâncias que são usadas para a produção desses produtos (TUMIR *et al.*, 2010; KRAWCZYK, 2014; SMICHOWSKI; LONDONIO, 2018). Essa combinação de fatores pode resultar em danos à saúde devido à presença, por exemplo, de metais em concentrações acima das recomendadas. Por outro lado, os suplementos dietéticos podem, também, não apresentar os ingredientes informados, o que resultaria na perda de eficiência do produto. Nesse sentido, a obtenção de informações quantitativas acerca da concentração, principalmente, de metais em suplementos

dietéticos é essencial para a garantia da segurança alimentar uma vez que não é possível verificar a qualidade de um produto com base apenas nos valores declarados nos rótulos (MARRERO *et al.*, 2013; SMICHOWSKI; LONDONIO, 2018).

Cabe salientar que existem diversos trabalhos na literatura que demonstram a determinação de metais em suplementos dietéticos. Os métodos analíticos descritos consistem, geralmente, no preparo da amostra utilizando reagentes concentrados e posterior determinação desses elementos por técnicas espectrométricas. Além disso, existem alguns trabalhos que descrevem o uso de técnicas que possibilitam a análise direta de sólidos, no entanto, essas técnicas ainda não são a melhor escolha para a determinação de metais. Isso é devido aos problemas que ainda são recorrentes quando essas técnicas são utilizadas como, possíveis efeitos de matriz, dificuldade de calibração, falta de homogeneidade da amostra, além da necessidade do uso de, em alguns casos, equipamentos com elevado custo de aquisição e manutenção. No Quadro 1 são apresentados alguns dos estudos que demonstram a determinação de metais em suplementos dietéticos.

Quadro 1. Métodos analíticos aplicados para a determinação de metais em suplementos dietéticos.

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos classificados como: produtos botânicos; produtos animais; produtos vitamínicos e/ou minerais e produtos sintéticos, extratos e óleos	Al, As, B, Br, C, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, Eu, Fe, Gd, H, K, Mg, Mn, Mo, N, Na, Ni, P, Pb, Rb, S, Sb, Sc, Se, Si, Sm, Sr, Ti, V e Zn	<p>a) Digestão por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional: 2,0 a 2,5 g de amostra foram digeridos com 25 mL de HNO₃ e 5 mL de HClO₄ concentrados. Em outro momento, 2,0 a 2,5 g de amostra foram digeridos com 25 mL de HNO₃ e 5 mL de H₂SO₄ concentrados. Ambos os digeridos foram diluídos com 50 mL de água ultrapura e centrifugados durante 5 min em 2000 rpm;</p> <p>b) Análise direta: 0,4 a 2,5 g de amostra foram envolvidos em filmes de PET, para a determinação dos analitos por INAA, ou em PTFE, para a determinação dos analitos por PGAA, e seladas por aquecimento. Em seguida as amostras foram acopladas a um reator para posterior análise.</p>	ASV, ICP OES, FAAS, GF AAS, INAA e PGAA	(HIGHT <i>et al.</i> , 1993)
Suplementos a base de ervas	Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn	<p>a) Digestão por via seca: 0,5 a 1,5 g de amostra foram misturados com Mg(NO₃)₂ na proporção de 1:1 em um cadinho de porcelana. A mistura foi carbonizada em chapa de aquecimento por aproximadamente 2 h e submetida a digestão por via seca em uma mufla a 470 ± 5 °C durante 16 h. As cinzas foram extraídas com HNO₃ 20% (v/v);</p> <p>b) Digestão por via úmida em sistema aberto: 0,3 a 0,8 g de amostra foram digeridos com uma mistura (6:1) de H₂SO₄ e HNO₃ concentrado em banho maria (55 °C) até a obtenção de uma solução de aspecto límpido.</p>	GF AAS e CVAAS	(WONG <i>et al.</i> , 1993)

PET: polietileno; **INAA:** análise por ativação com nêutrons instrumental; **PTFE:** politetrafluoretileno; **PGAA:** análise por ativação com nêutrons com detecção por raios gama prontos; **ASV:** voltametria de redissolução anódica; **ICP OES:** espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; **FAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em chama; **GFAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite; **CVAAS:** espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos multivitamínicos	Ca, Cr, Mg, Mn e Zn	<p>a) Digestão por via úmida em sistema aberto: 5 g de amostra foram digeridos com 25 mL de HNO₃, 25 mL de HCl concentrados e 50 mL de água ultrapura durante 30 min com o auxílio de uma chapa de aquecimento. Soluções resultantes foram filtradas e diluídas previamente a análise.</p> <p>b) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: os autores não informam a massa de amostra e os reagentes utilizados. As amostras foram digeridas em aproximadamente 50 min (10 min a 100 W; 10 min a 300 W; 15 min a 1000 W e 15 min a 0W).</p>	ICP OES	(KRAMPITZ; BARNES, 1998)
Drogas naturais utilizadas pelos chineses como suplementos (medicamentos tradicionais) e que foram classificadas em três categorias: plantas, animais e minerais	As, Cd, Co, Cu, Hg, Mn e Pb	Digestão por via úmida em sistema aberto com refluxo utilizando aquecimento convencional: 1,0 g de amostra foi digerido utilizando 5 mL de uma mistura de ácidos concentrados (HNO ₃ , H ₂ SO ₄ e HClO ₄ na proporção de 3:1:1). A solução evaporada do frasco de digestão foi conduzida através do sistema e condensada em outro recipiente. Essa solução foi colocada aos poucos de volta no frasco digestão para que fosse novamente digerida. Esse ciclo foi repetido 3 vezes para garantir a completa digestão da amostra.	FAAS, GF AAS e CVAAS	(CHUANG <i>et al.</i> , 2000)

ICP OES: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; **FAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em chama; **GFAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite; **CVAAS:** espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos a base de ginseng: sólidos (na forma de cápsulas e tabletes) e líquidos (tinturas da planta)	As, Cd, Cr, Hg, Ni e Pb	<p>a) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,5 a 3 g de amostra foram digeridos com uma mistura de 3 mL de HNO₃, 2 mL de HCl, 2 mL de H₂SO₄ concentrados e 5 mL de água ultrapura durante 40 min em uma temperatura e pressão máxima de 120 °C e 130 psi, respectivamente;</p> <p>b) Digestão por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional: 0,5 a 5,0 g de amostra foram digeridos com uma mistura de 5 mL de HNO₃ e 5 mL de HCl concentrados. As misturas foram digeridas por no mínimo 6 h.</p>	GF AAS e CVAAS	(KHAN <i>et al.</i> , 2001)
Suplementos dietéticos minerais e/ou vitamínicos, além de matérias-primas farmacêuticas	Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, P, Se e Zn	Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,2 a 0,6 g (tabletes) ou 0,16 g (cápsulas) de amostra foram digeridos com 3 mL de HNO ₃ concentrado. A digestão foi realizada em 4 etapas em potência de irradiação igual a 280 W. Durante a digestão, a pressão e temperatura máxima foram de 45 atm e 155 °C, respectivamente.	ICP-MS e ETAAS	(SOŁTYK <i>et al.</i> , 2003)

GFAAS: espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite; **CVAAS:** espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio; **ICP-MS:** espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; **ETAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos botânicos	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Pb, Pd, Sn, Sb, Tl, U, V, W e Zn	Digestão por via úmida em sistema fechado com aquecimento convencional – “Bomba de PTFE”: 0,4 g de amostra foram digeridos com 10 mL de HNO ₃ em uma chapa de aquecimento (~75 °C) por 16 h. Em seguida, 6 mL de HNO ₃ foram adicionados aos frascos, que foram novamente aquecidos em chapa de aquecimento sob a mesma temperatura por mais 24 h. Após isso, mais 6 mL de HNO ₃ foram adicionados aos frascos para mais uma etapa de aquecimento por 18 h. Previamente as etapas de aquecimento as misturas foram sonicadas em banho de ultrassom por 2 h e, quando necessário, deixadas em repouso por mais 4 h. Por fim, as soluções resultantes foram evaporadas e 10 mL de uma solução de HNO ₃ 10 mol L ⁻¹ foram adicionados aos frascos.	ICP-MS	(RAMAN <i>et al.</i> , 2004)
Suplementos dietéticos multivitamínicos	Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, V e Zn	<p>a) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,3 a 0,5 g de amostra foram digeridos com 6 mL de HNO₃ concentrado durante 10 min a 560 W e, posteriormente, por 10 min a 700 W;</p> <p>b) Extração ácida assistida por ultrassom: 0,1 a 0,2 g de amostra, 6 mL de HNO₃ e 50 mL de água deionizada. Essa mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min. Após isso, as soluções resultantes foram filtradas;</p> <p>c) Preparo de suspensões: 0,1 a 0,2 g de amostra, 6 mL de HNO₃ e 30 ou 50 mL de água deionizada foram misturados. Essa mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min.</p>	ICP OES	(KREJČOVÁ <i>et al.</i> , 2006)

ICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; **ETAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; **ICP OES:** espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos de diversos tipos: minerais, vitamínicos, botânicos, proteicos, aminoácidos, entre outros	Cd, Cu, Hg, Pb e Zn	Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,35 g de amostra foram digeridos com uma mistura de 4 mL de HNO ₃ concentrado, 4 mL de HF 48% (v/v) e 1 mL de HCl concentrado durante 15 min a 175 °C e 1 min a 200 °C. Por fim, 12 mL de uma solução de H ₃ BO ₃ 4% (v/v) foram adicionados lentamente as amostras, as quais foram submetidas a uma terceira etapa de digestão durante 20 min a 165 °C.	FAAS, GF AAS e CVAAS	(GARCÍA-RICO <i>et al.</i> , 2007)
Suplementos dietéticos multivitamínicos/minerais	Cu, Fe, Mn e Zn	a) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,12 g de amostra foram digeridos com 5 mL de HNO ₃ concentrado em aproximadamente 9 min (2 min a 300 W; 5 min a 720 W; 5 min a 200 W e 2 min a 0 W); b) Extração assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 50 mg de amostra foram misturados com 10 mL de uma solução de HNO ₃ 0,7 mol L ⁻¹ . As soluções foram aquecidas por 15 min a 360 W.	FAAS	(SORIANO <i>et al.</i> , 2007b)

FAAS: espectrometria de absorção atômica com atomização em chama; **GFAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite; **CVAAS:** espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos multivitamínicos/minerais	Cu, Fe, Mn e Zn	<p>a) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,12 g de amostra foram digeridos com 5 mL de HNO₃ concentrado em aproximadamente 9 min (2 min a 300 W; 5 min a 720 W; 5 min a 200 W e 2 min a 0 W);</p> <p>b) Métodos de extração empregando ultrassom ou agitação magnética: 0,12 g de amostra foram misturados com 20 mL de HCl 1 mol L⁻¹. A mistura foi colocada em banho ultrassônico ou em agitador magnético durante 5 min.</p>	FAAS	(SORIANO <i>et al.</i> , 2007a)
Suplementos dietéticos multivitamínicos/minerais	Ag, Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, Mg, Mn, Ni, Pb, Se e Zn	<p>a) Digestão por via úmida em sistema fechado com aquecimento convencional: 0,2 g de amostra foram digeridos com 5 mL de HNO₃ concentrado em um bloco digestor por 90 min a 120 °C, a partir do uso de uma rampa de aquecimento (acrécimo de 10 °C por min);</p> <p>b) Preparo de suspensões: 1 g de amostra foi misturado com 5 mL de uma solução de HNO₃ 0,8 mol L⁻¹ e aproximadamente 10 mL de água deionizada. Durante a nebulização, as soluções foram continuamente agitadas com o auxílio de um agitador magnético.</p>	ICP OES	(ZACHARIADIS; OLYMPIOU, 2008)

FAAS: espectrometria de absorção atômica com atomização em chama; **ICP OES:** espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos polivitamínicos e/ou minerais; botânicos; à base de mel e de origem animal	As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb e Zn	Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,3 g de amostra foram digeridos com 5 mL de HNO ₃ concentrado e 1 mL de água ₂ durante 20 min (rampa de aquecimento de 10 min até 1400 W e temperatura máxima de 220 °C com permanência de 10 min nessa condição).	FAAS, GF AAS, HGAAS e CVAAS	(TUMIR <i>et al.</i> , 2010)
Produtos botânicos naturais e comerciais e suplementos dietéticos botânicos	Al, As, Ba Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, V, Se, Sr, Zn	Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,1 a 0,5 g de amostra foram transferidas para frascos de digestão de PTFE e 10 mL de uma mistura de HNO ₃ e HCl (8:2) foram adicionados. Em seguida as soluções foram levadas a digestão em forno micro-ondas. O programa de irradiação utilizado consistiu de uma breve rampa de 5 min até alcançar a temperatura de 180 °C e, posteriormente, mais 15 min de digestão a 1600 W. Após isso, as soluções foram filtradas e transferidas para frascos volumétricos para posterior análise.	ICP-MS	(AVULA <i>et al.</i> , 2010)

FAAS: espectrometria de absorção atômica com atomização em chama; **GFAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite; **HGAAS:** espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos; **CVAAS:** espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio; **ICP-MS:** espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos multivitamínicos/minerais, botânicos, proteicos e suplementos contendo outras substâncias não minerais (como fibras, fitoesteróis, bioflavonóides, entre outros)	Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V e Zn	Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,2 g (sólidas) ou 2 mL (líquidas) de amostra foram digeridos com 10 mL de uma mistura ácida contendo 8 mL de HNO ₃ e 2 mL de HCl concentrados. O programa de irradiação utilizado consistiu de uma breve rampa de 5 min até alcançar a temperatura de 180 °C e, posteriormente, mais 15 min de digestão a 1600 W. Os digeridos com resíduos sólidos foram centrifugados previamente a determinação dos analitos.	ICP-MS	(AVULA <i>et al.</i> , 2011)
Suplementos dietéticos botânicos	Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, V e Zn.	a) Análise direta por LA-ICP-MS: 0,5 g de amostra foram prensados em uma prensa hidráulica (4 Mpa). Após isso, os comprimidos formados, com espessura variável de 2 a 4 mm, foram utilizados para a análise; b) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,2 g de amostra foram digeridos com uma mistura de 10 mL de HNO ₃ , 1 mL de água ₂ e 1 mL de HF. O programa de irradiação consistiu em uma rampa de aquecimento de 30 min até 160 °C e mais 40 min nessa mesma temperatura.	LA-ICP-MS e ICP-MS	(BU <i>et al.</i> , 2013)

ICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; **LA-ICP-MS:** espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com ablação por laser.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos contendo vitaminas, minerais, extratos de plantas e outras substâncias	As, Bi, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, V e Zn	Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 0,5 g foram digeridos com 7 mL de HNO ₃ e 3 mL de água ² concentrados. A mistura foi deixada em repouso <i>overnight</i> e, então, submetida a digestão em forno micro-ondas – 1 min a 250 W; 1 min a 0 W; 5 min a 250 W; 5 min a 400 W e 5 min a 600 W – totalizando 17 min.	ICP OES	(MARRERO <i>et al.</i> , 2013)
Suplementos dietéticos de cálcio em formulações com vitamina D, vitamina C ou fosfatos	As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, K, Na, Nd, Ni, Rb, Sb, Sc, Sm, Sn, Sr e Zn	<p>a) Análise direta: 150 mg de amostra, previamente moídas e homogeneizadas, foram colocados em cápsulas de polietileno que foram seladas por aquecimento e acopladas ao reator para posterior análise;</p> <p>b) Digestão por via úmida em sistema aberto com refluxo e aquecimento convencional: 0,5 g de amostra foram transferidos para um balão de 100 mL acoplado a um longo condensador (25 cm) e 2 mL de HNO₃ destilado foram adicionados. O frasco foi aquecido durante 40 min a 80 °C e agitado ocasionalmente.</p>	INAA, FAAS e GF AAS	(WAHEED <i>et al.</i> , 2014)

ICP OES: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; **INAA:** análise por ativação com nêutrons instrumental; **FAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em chama; **GFAAS:** espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos dietéticos multivitamínicos	As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Se	<p>a) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 250 mg de amostra foram digeridos com 1 mL de água 30%, 4 mL de HNO₃ e 1,5 mL de HF. A amostra foi submetida a aquecimento em um sistema com radiação micro-ondas focalizada durante 20 min a 300 W e as soluções resultantes analisadas.</p> <p>b) Preparo de suspensões: 250 mg (para a determinação de As, Cd e Pb) ou 25 mg (para a determinação de Cr, Cu, Fe, Mn e Se) foram com 5,2 mL de HNO₃ concentrado e 25 µl de uma solução de Triton X-100 10% (v/v) foram adicionados e as suspensões obtidas homogeneizadas com um auxílio de uma sonda ultrassônica e um agitador mecânico.</p>	HR-CS-GF AAS	(KRAWCZYK, 2014)
Suplementos dietéticos minerais e/ou vitamínicos	Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se, e Zn	Digestão por via úmida em sistema aberto com refluxo e aquecimento convencional: 0,25 g de amostra e 5 mL de HNO ₃ concentrado foram transferidos para frascos de digestão e deixados em repouso por 60 min. Os frascos contendo as soluções foram aquecidos em um bloco digestor (sistema comercial de digestão com refluxo) por 30 min a 120 °C e, posteriormente, por mais 2 h a 140 °C.	ICP OES e ICP-MS	(TOKALIOĞLU <i>et al.</i> , 2014)

HR-CS-GFAAS: espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite; **ICP OES:** espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; **ICP-MS:** espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Suplementos esportivos	As, Cd, Cu, Cr, Pb, S, P e Zn	Digestão assistida por micro-ondas sob pressão de oxigênio: 1350 mg de amostra foram digeridos com 6 mL de HNO ₃ 5 mol L ⁻¹ e 5 bar de O ₂ . As amostras foram submetidas ao seguinte programa de irradiação com micro-ondas: i) rampa de 5 min até 800 W; ii) 5 min a 800 W; iii) 10 min a 1000 W e iv) 20 min a 0 W (resfriamento).	ICP OES e IC	(CRIZEL, 2015)
Bebidas e suplementos botânicos	Cu, Mg, Mn, Si e Zn	Extração com água quente: 1 g de amostra foi misturado com 100 mL de água ultrapura fervente e deixado em repouso por 15 min. A mistura foi filtrada e deixada para resfriar a temperatura ambiente. Em seguida, 20 mL da solução resultante foram diluídos a 25 mL visando a obtenção de uma concentração final de 0,6% (m/v) de HNO ₃ e de 10 g L ⁻¹ de uma solução tampão de La ₂ O ₃ .	HR-CS-FAAS	(GÓMEZ-NIETO <i>et al.</i> , 2017)
Suplementos dietéticos, minerais e/ou multivitamínicos, botânicos e de origem animal	As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sn, V e Zn	Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: aproximadamente 1 g de amostra foram digeridos com 5 mL de HNO ₃ e 2 mL de água ² concentrados. As amostras foram submetidas ao seguinte programa de irradiação com micro-ondas: i) rampa de 3 min até 100 °C com 1000 W; ii) 4 min a 100 °C com 1000 W; iii) rampa de 3 min até 150°C com 1000 W; iv) 4 min a 150 °C com 1000 W; v) rampa de 10 min até 200 °C com 1000W; vi) 10 min a 200 °C com 1000W; vii) resfriamento realizado <i>overnight</i> a temperatura ambiente.	ICP OES e ICP-MS	(UDOUSORO <i>et al.</i> , 2017)

ICP OES: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; **IC:** cromatografia de íons; **HR-CS-GFAAS:** espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite; **ICP-MS:** espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado”.

(continuação)

AMOSTRAS	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO	REF.
Leite em pó e suplementos dietéticos	Ca, K e Mg	<p>a) Análise direta: 500 mg de amostra foram prensados na forma de pellets em prensa hidráulica usando aproximadamente 10 toneladas-força de pressão.</p> <p>b) Digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado: 250 mg de amostras foram digeridos com 6 mL de HNO₃ 2 mol L⁻¹ e 3 mL de água₂ 30% (m/m). As amostras foram submetidas ao seguinte programa de irradiação com micro-ondas: i) rampa de 5 min até 120 °C com 1260 W; ii) 5 min a 120 °C com 1260 W; iii) rampa de 5 min até 160°C com 1260 W; iv) 5 min a 160 °C com 1260 W; v) rampa de 5 min até 230 °C com 1260W; vi) 10 min a 230 °C com 1260W.</p>	LIBS e ICP OES	(AUGUSTO <i>et al.</i> , 2017)

LIBS: espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser; **ICP OES:** espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

Dentre as técnicas de análise direta de sólidos utilizadas para a determinação de metais em suplementos dietéticos, destaca-se a Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) (HIGHT *et al.*, 1993; WAHEED *et al.*, 2014). Essa técnica é considerada como referência devido as inúmeras vantagens que apresenta, tais como, determinação multielementar, pequena suscetibilidade à efeitos de matriz, elevada sensibilidade, linearidade em qualquer faixa de medição (medida absoluta), além de boa exatidão para a maioria dos elementos da tabela periódica (GREENBERG, 2008; GREENBERG *et al.*, 2011; PETRONI, 2015). Por outro lado, além das desvantagens inerentes da análise direta de sólidos, essa técnica necessita de instrumentação complexa (reator nuclear), o que de fato é um dos principais empecilhos para aplicação. Além de tudo, existe ainda a necessidade de manipulação de material radioativo, assim como de tratamento dos resíduos gerados (EHMANN; VANCE, 1991).

Portanto, o uso de técnicas que apresentam instrumentação menos complexa, como as espectrométricas, ainda é a melhor opção para a determinação de metais em suplementos dietéticos. Como pode ser observado no Quadro 1, as técnicas espectrométricas como a FAAS, GF AAS, ICP OES e ICP-MS são as mais utilizadas para essa finalidade. Essas técnicas se destacam por serem mais simples, quando comparadas com as técnicas para a análise direta de sólidos, além de apresentarem excelente sensibilidade, bem como precisão e exatidão adequada para determinação elementar em nível traço. No entanto, geralmente necessitam que a matriz da amostra seja eliminada e que as espécies químicas de interesse estejam presentes em uma solução aquosa livre de possíveis interferentes (acidez, carbono residual, salinidade) para introdução nos equipamentos.

Nesse sentido, em vista dos suplementos dietéticos apresentarem composição que varia de acordo com o tipo de produto, o uso de métodos de preparo de amostras mais robustos é geralmente preferido. Os métodos de digestão com ácidos concentrados e aquecimento (convencional ou micro-ondas) em sistemas abertos ou fechados são os mais utilizados, como apresentado no Quadro 1. Além de serem adequados em muitos casos, esses métodos disponibilizam os analitos em soluções, supostamente, adequadas para a determinação por técnicas espectrométricas (KRUG; ROCHA, 2016).

Contudo, deve-se ressaltar que a escolha das técnicas espectrométricas para a determinação de metais em suplementos dietéticos não se deve somente ao fato de

apresentarem parâmetros analíticos adequados. Ou seja, o uso dessas técnicas é provavelmente devido, também, as características dos digeridos obtidos, uma vez que proporcionam a completa digestão da matriz. Entretanto, os digeridos apresentam elevados teores de ácido residual, o que torna necessária uma etapa de diluição previamente a determinação dos analitos. Essa etapa evita que danos sejam causados aos equipamentos, porém prejudica consideravelmente os limites de detecção (LOD, do inglês “*limit of detection*”) e quantificação (LOQ, do inglês “*limit of quantification*”) dos métodos. É provavelmente devido a isso que, por exemplo, a cromatografia de íons com sistema de detecção por condutividade (IC-CD) – técnica menos sensível que as espectrométricas, mas que apresenta relativo baixo custo e possibilita a determinação multielementar de metais – ainda não tenha sido empregada para a determinação desses elementos em suplementos dietéticos ou outras amostras de difícil decomposição (MICHALSKI, 2009; CALAND *et al.*, 2012).

Nos itens a seguir serão descritas algumas características das técnicas analíticas mais utilizadas para a determinação de metais. Posteriormente, pretende-se apresentar algumas considerações acerca da etapa de preparo de amostras requerida para a determinação desses elementos.

3.2 TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS

3.2.1 Técnicas espectrométricas

Diversas técnicas instrumentais têm sido empregadas para a determinação de metais, dentre as quais, destacam-se as espectrométricas como a FAAS, GF AAS, ICP OES e ICP-MS, por serem amplamente utilizadas (BOSS; FREDEEN, 1999; WELZ; SPERLING, 2008; BINGS *et al.*, 2010). Cabe mencionar que os princípios dessas técnicas são bem estabelecidos na literatura e, devido a isso, não serão discutidos neste trabalho (MONTASER, 1998; BRENNER; ZANDER, 2000; WELZ; SPERLING, 2008; WEISS, 2016). Os parâmetros analíticos e as características de cada uma dessas técnicas são resumidamente apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características analíticas das técnicas instrumentais mais utilizadas para a determinação de metais em suplementos dietéticos. Adaptado de Barin (2007).

Características analíticas		ICP-MS	ICP OES	GF AAS	FAAS
Instrumentação		complexa	complexa/moderada	moderada	moderada
Determinação multielementar		sim	sim	não	não
Faixa de trabalho		$\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}	mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$	mg L^{-1}
Nível de interferências	Espectrais	alto	alto/médio	médio	médio
	Não espectrais	médio	médio	baixo	médio
Custo de aquisição		muito alto	alto	médio/alto	médio/ baixo
Custo de manutenção		alto	alto	médio/alto	médio

A ICP-MS é, das técnicas apresentadas na Tabela 1, a mais sensível (faixa de trabalho vai de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) e a que possibilita a determinação do maior número de elementos (mais de 75 elementos) (MONTASER, 1998; NELMS, 2005; BEAUCHEMIN, 2010). No entanto, um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado apresenta elevado custo de aquisição e manutenção. Além dos custos com peças (tochas, nebulizadores, cones, etc.), deve-se também levar em consideração o elevado consumo de argônio, uma vez que esse gás é utilizado para gerar o plasma, bem como no processo de nebulização. O consumo de argônio durante uma análise é geralmente maior que 10 L min^{-1} . Além disso, a ICP-MS requer instrumentação complexa e apresenta elevada suscetibilidade a interferências espectrais e não espectrais, dentre as quais pode-se citar as relacionadas a formação de íons poliatômicos, isobáricos e de carga dupla, assim como a ocorrência de depósitos de compostos da matriz nos componentes do equipamento (interface, lente iônica e tocha), dificuldades no transporte de amostra, mudanças na composição do plasma, efeitos de supressão de sinal, dentre outras (MONTASER, 1998; NELMS, 2005; BARIN, 2007).

A ICP OES apresenta muitas similaridades com a ICP-MS como, por exemplo, a capacidade de determinação multielementar e a elevada frequência de análise quando comparada as outras técnicas apresentadas na Tabela 1. Apesar de ter menor sensibilidade (faixa de trabalho vai de mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) que a ICP-MS, dispõe de instrumentação menos complexa, menor custo de aquisição e menor número de interferências espectrais (BOSS; FREDEEN, 1999; HOU *et al.*, 2000; BARIN, 2007). As interferências não espectrais são similares àquelas observadas para a ICP-MS. Apesar de menos sensível que a ICP-MS, a ICP OES também apresenta diversas aplicações para a determinação de metais em uma grande variedade de amostras (BRENNER; ZANDER, 2000). Cabe ressaltar que, assim como para a análise por ICP-MS, a etapa de preparo de amostras pode ser limitante para a ocorrência de algumas das interferências comentadas anteriormente. Portanto, é evidente a importância da avaliação de métodos alternativos de preparo de amostras, os quais possibilitem o uso de reagentes diluídos sem a perda de eficiência de digestão (BIZZI *et al.*, 2014; HARTWIG *et al.*, 2016; MESKO *et al.*, 2018).

Por sua vez, as técnicas de espectrometria de absorção atômica apresentadas na Tabela 1 (GF AAS e FAAS) ainda têm sido amplamente utilizadas para a determinação de metais (WELZ; SPERLING, 2008; WU *et al.*, 2009; BINGS *et al.*,

2010). Isso se deve, principalmente, por serem mais simples que a ICP-MS e a ICP OES, além dos equipamentos apresentarem custo de aquisição relativamente inferior. Além disso, os custos relativos à manutenção desses equipamentos também são menores quando comparados aos das técnicas com plasma indutivamente acoplado. A GF AAS por necessitar do uso de argônio (como gás de purga) e da substituição do tubo de grafite devido ao desgaste natural, tem custo de manutenção mais elevado que a FAAS. Apesar disso, apresenta maior sensibilidade (faixa de trabalho é da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$) e necessita de pequeno volume de amostra (10 a 50 μL) quando comparada a FAAS (WELZ; SPERLING, 2008).

Embora as técnicas de absorção atômica sejam suscetíveis a um menor número de interferências espectrais e não-espectrais quando comparada a ICP-MS e ICP OES, são monoelementares e, em consequência disso, elevam custos e, principalmente, o tempo de análise quando se pretende determinar a concentração de mais elementos. Outro aspecto importante é que essas técnicas apresentam uma estreita faixa de calibração e, dependendo da concentração dos analitos na amostra, podem ser necessárias sucessivas etapas de diluição dos digeridos (BARIN, 2007; WELZ; SPERLING, 2008).

3.2.2 Cromatografia de íons

As técnicas espectrométricas são, definitivamente, as mais utilizadas atualmente para a determinação de metais em uma ampla variedade de amostras. Apesar disso, a cromatografia de íons apresenta características que podem torná-la uma interessante alternativa as técnicas espectrométricas para a determinação de metais em suplementos dietéticos como, por exemplo, o relativo baixo custo de aquisição e manutenção, o fato de possibilitar o uso de uma instrumentação bastante simples e, ainda, a determinação multielementar sequencial em uma ampla faixa de trabalho (mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) (JACKSON, 2000).

O uso da IC para a determinação de ânions em diversos tipos de matrizes é bastante consolidado (JACKSON, 2000; FRITZ; GJERDE, 2009; MORALES-RUBIO; DE LA GUARDIA, 2015). Isso está provavelmente relacionado a grande variedade de métodos de preparo de amostras que têm sido desenvolvidos ao longo dos anos para

essa finalidade. Esses métodos consistem na decomposição da matriz ou extração dos analitos da matriz a partir do uso de soluções alcalinas diluídas e/ou solventes orgânicos. Por outro lado, o número de trabalhos empregando a IC para a determinação de cátions é consideravelmente inferior quando comparada a determinação de ânions (MORALES-RUBIO; DE LA GUARDIA, 2015). Apesar disso, cabe mencionar que a IC vem sendo utilizada a mais de 50 anos para a determinação de cátions (metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição) em matrizes menos complexas (geralmente líquidas), as quais podem ser simplesmente filtradas e/ou diluídas previamente a análise (MICHALSKI, 2009; CALAND *et al.*, 2012).

Como comentado anteriormente, a IC tem sido pouco explorada para a determinação de metais, entretanto, quando se trata da análise de matrizes sólidas o número de aplicações é praticamente inexistente. Isso está relacionado, provavelmente, ao uso de ácidos concentrados na etapa de preparo de amostras é utilizado para proporcionar a completa digestão da matriz, o que geralmente resulta na disponibilização dos analitos em solução. No entanto, as soluções resultantes do preparo de amostras usando ácidos concentrados são inapropriadas para a determinação de metais por IC-DC. Isso ocorre devido a elevada acidez residual dessas soluções, as quais ocasionam interferências cromatográficas (linha base com valores de condutividade elevados, saturação dos sítios ativos da coluna devido a elevada carga iônica, danos a coluna cromatográfica, dentre outros) que afetam de maneira considerável a separação dos analitos na coluna, assim como a posterior determinação em sistemas cromatográficos com detecção por condutividade. Vale ressaltar que essas interferências afetam a sensibilidade, a precisão e a exatidão da técnica (FRITZ; GJERDE, 2009; WEISS, 2016).

Assim, é evidente que o maior desafio para a determinação de cátions em matrizes complexas (como os suplementos dietéticos) por IC é a etapa de preparo da amostra. Desse modo, o desenvolvimento e avaliação de métodos alternativos de preparo de amostras, os quais possibilitem uma decomposição eficiente com uso de soluções diluídas, é essencial para que a IC-DC possa ser difundida e, quiçá, consolidada como uma alternativa a determinação de metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição em amostras de difícil decomposição.

A seguir serão descritas algumas generalidades da técnica de cromatografia de íons, com mais detalhes para a separação de cátions, bem como algumas

definições que serão importantes para o entendimento da otimização das condições cromatográficas visando a posterior avaliação da combustão iniciada por micro-ondas para o preparo de amostras de suplementos dietéticos.

3.2.2.1 Fundamentos e aplicações em IC

A cromatografia de íons foi introduzida por Small *et al.* (1975) e em poucos anos consolidou-se como uma técnica bastante versátil para a determinação de ânions e cátions. A técnica consiste na separação de espécies iônicas em uma coluna cromatográfica, a qual é geralmente constituída por uma base polimérica funcionalizada com grupos trocadores de íons que apresentam cargas contrárias. Assim as espécies iônicas tendem a interagir com os grupos trocadores na coluna cromatográfica em um processo reversível que promove a separação dessas espécies de acordo com a intensidade de interação com os sítios ativos da coluna. A fase móvel, por sua vez, também contém espécies iônicas, e uma competição entre os íons da amostra e da fase móvel pelos grupos trocadores é estabelecida. Portanto, tanto ânions quanto cátions são separados devido à adsorção reversível e diferencial dos analitos nos grupos trocadores da coluna cromatográfica (FRITZ; GJERDE, 2009). Embora outras abordagens possam ser utilizadas para a separação de espécies iônicas na cromatografia de íons, como a formação de par iônico e a exclusão iônica, a troca iônica continua sendo o principal mecanismo de separação utilizado (JACKSON, 2000). Dessa forma, neste trabalho os fenômenos de separação por formação de par iônico e exclusão iônica não serão abordados.

Como pode ser observado na Figura 1, a instrumentação de um cromatógrafo de íons consiste basicamente em: um reservatório para fase móvel, uma bomba de alta pressão, uma alça de amostragem, uma coluna de separação, um detector e um dispositivo de aquisição de dados. Existe, ainda, a possibilidade do uso de um sistema de supressão previamente ao sistema de detecção, que tem como função reduzir o sinal de fundo (condutividade) da fase móvel e, com isso, possibilitar a determinação de espécies iônicas em baixíssimas concentrações. Os produtos das reações químicas que ocorrem no sistema de supressão em um sistema de cromatografia de cátions, por exemplo, resumem-se a água e as respectivas bases dos cátions

presentes na fase móvel. Como consequência disso, a sensibilidade da técnica é aumentada. Embora o uso de um sistema de supressão química na cromatografia aniônica seja fundamental para possibilitar a determinação em baixas concentrações (da ordem de mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), os sistemas cromatográficos sem supressão química tem sido utilizados com sucesso para a determinação de cátions na ordem de mg L^{-1} (MICHALSKI, 2009; CALAND *et al.*, 2012; WEISS, 2016). Isso tem sido possível devido ao uso de colunas analíticas de baixa capacidade, as quais possibilitam a separação de cátions através do uso de fases móveis diluídas que geram sinais de fundo relativamente baixos.

A detecção condutimétrica direta (sem supressão química) torna o sistema cromatográfico ainda mais simples e, na cromatografia de cátions, possibilita a determinação de alguns metais de transição, o que não é possível nos sistemas cromatográficos com supressão química devido aos problemas relacionados a formação de hidróxidos insolúveis (FRITZ; GJERDE, 2009; WEISS, 2016). Tendo em vista que nesta tese será proposto o desenvolvimento de métodos analíticos visando a determinação de metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição por cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta, os sistemas de supressão química não serão explorados durante esta revisão.

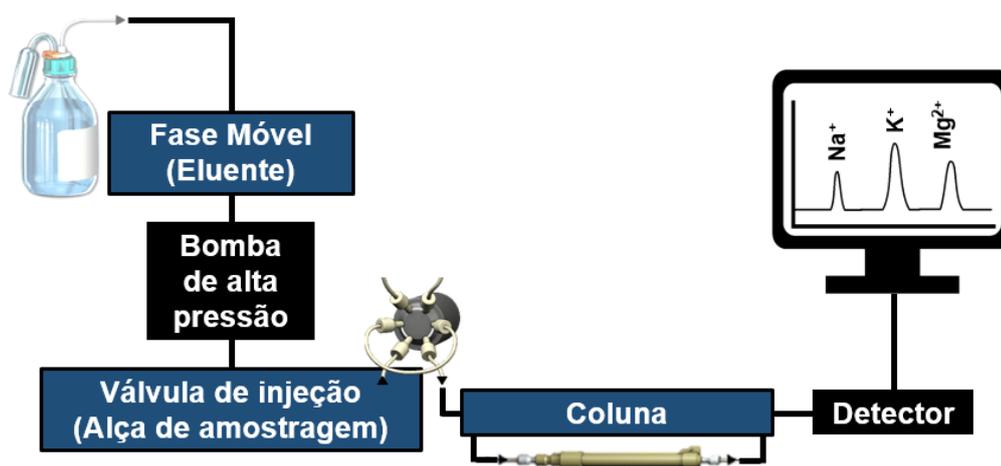


Figura 1. Descrição de um sistema compacto de cromatografia de íons com detecção condutimétrica direta.

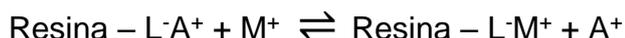
Em um cromatógrafo de íons, a bomba de alta pressão força a passagem da fase móvel por todo o sistema até a sua estabilização (que geralmente é

acompanhada pela linha base obtida devido ao sinal no detector). A próxima etapa é a injeção da amostra que resulta no preenchimento da alça de amostragem. A partir disso, a amostra – que é carregada pela fase móvel – chega até a coluna cromatográfica onde ocorre efetivamente a separação dos analitos. Após a separação na coluna cromatográfica, os analitos chegam ao detector e um sinal – que é diretamente proporcional a concentração – é gerado e processado em um dispositivo de aquisição de dados. Vale ressaltar que embora existam outros tipos de detecção na IC, como a detecção espectrofotométrica e a detecção amperométrica, neste trabalho somente a detecção condutimétrica será considerada, uma vez que se trata do tipo de detecção mais utilizado na cromatografia de íons e, também, por se tratar do sistema de detecção que irá ser usado neste trabalho.

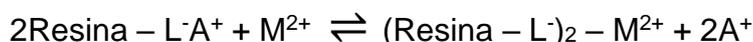
Na cromatografia de íons, dependendo da fase móvel e da fase estacionária selecionadas, diversas espécies iônicas podem ser separadas e quantificadas. A determinação de cátions (metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição), por exemplo, tem sido realizada através do uso de colunas com trocadores catiônicos fracos (de baixa capacidade), como as resinas carboxílicas e as resinas sulfônicas (FRITZ; GJERDE, 2009; WEISS, 2016). Enquanto que as colunas com trocadores catiônicos fracos permitem a separação de cátions a partir do uso de soluções com concentrações reduzidas e/ou contendo espécies que geram um sinal de condutividade relativamente baixo, as colunas com trocadores catiônicos fortes, praticamente em desuso atualmente, necessitam de soluções mais concentradas e/ou contendo espécies iônicas que ocasionam um aumento considerável do sinal de fundo. Além disso, o uso de colunas com trocadores catiônicos fortes dificulta a separação de espécies monovalentes e divalentes em uma mesma corrida cromatográfica. É provavelmente devido a isso que o uso de colunas com trocadores catiônicos fortes tem ocorrido na maioria dos casos em sistemas cromatográficos com supressão química.

De acordo com o tipo de coluna selecionada, diversas substâncias químicas podem ser utilizadas para o preparo da fase móvel. O uso de colunas com trocadores catiônicos fortes requer o uso de soluções mais concentradas e/ou que forneçam uma quantidade considerável de cátions em solução para alterar o equilíbrio químico das espécies iônicas na fase estacionária e na fase móvel (HADDAD; JACKSON, 1990). Nas reações (1) e (2) é possível verificar o equilíbrio químico de duas espécies catiônicas – monovalente (M^+) e divalente (M^{2+}), respectivamente – em uma coluna

com um trocador catiônico (L^-), quando uma fase móvel contendo íons monovalentes (A^+) é utilizada. Através desse mecanismo de separação, que é o mais comum na cromatografia de íons, os cátions da amostra são “empurrados” em diferentes taxas pela coluna devido a constante reação de troca iônica entre os íons da fase móvel e da fase estacionária (HADDAD; JACKSON, 1990; FRITZ; GJERDE, 2009).



Reação 1.



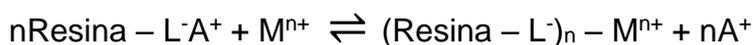
Reação 2.

Soluções de HCl, H₂SO₄ ou HNO₃ em concentrações que podem variar de 2 a 40 mmol L⁻¹, dependendo da coluna utilizada (comprimento, diâmetro interno, tamanho de partícula, etc.), são as mais utilizadas para a separação de íons monovalentes, como os metais alcalinos. Íons divalentes, como os metais alcalinos terrosos, interagem fortemente com colunas que apresentam trocadores catiônicos fortes sendo necessário o uso de elevadas concentrações desses ácidos para promover uma separação eficiente. No entanto, em sistemas com detecção condutimétrica direta, o uso de concentrações elevadas desses ácidos eleva de maneira considerável a condutividade da linha base (sinal de fundo), inviabilizando a quantificação dessas espécies na maioria dos casos, a exceção dos sistemas cromatográficos com supressão química (FRITZ; GJERDE, 2009; WEISS, 2016). Por outro lado, o uso de sistemas cromatográficos com supressão química, como comentado anteriormente, inviabiliza a determinação de íons dos metais de transição devido a formação de hidróxidos insolúveis. Portanto, quando a detecção for condutimétrica, os íons de metais de transição só podem ser determinados em sistemas cromatográficos sem supressão química.

Ao contrário dos íons de metais alcalinos e de metais alcalinos terrosos, os íons de metais de transição não são separados através do uso de fases móveis contendo cátions monovalentes (H⁺, Na⁺, etc.), independentemente do tipo de coluna utilizada. Isso ocorre em virtude do coeficiente de seletividade para os elementos de transição

de mesma carga serem muito semelhantes (FRITZ; GJERDE, 2009). Para que seja possível a separação desses íons, faz-se necessário a introdução de um segundo equilíbrio químico durante a separação na coluna como, por exemplo, o equilíbrio de complexação, o qual ocorre através da adição de agentes complexantes à fase móvel.

Os agentes complexantes mais comuns são os ácidos orgânicos fracos que formam, preferencialmente, complexos aniônicos ou neutros com íons metálicos, tais como o ácido cítrico, o ácido oxálico, o ácido tartárico, o ácido dipicolínico (também conhecido como ácido 2,6-piridinocarboxílico, ácido piridina-2,6-dicarboxílico, PDC, PDA ou DPA) entre outros. No entanto, outras substâncias químicas também têm sido utilizadas com sucesso para separação de íons monovalentes e divalentes (incluindo alguns metais de transição) como, por exemplo, o ácido metanossulfônico (MSA). Uma das principais vantagens dos reagentes supracitados, além de proporcionarem uma adequada separação dessas espécies, é a relativa baixa condutividade equivalente, que possibilita o uso de sistemas cromatográficos com detecção condutimétrica direta sem uma considerável perda de sensibilidade. A formação de complexos com os cátions da amostra reduz consideravelmente a interação com os trocadores catiônicos da coluna. No entanto, muitas vezes, dois agentes complexantes diferentes são requeridos para a separação de determinadas espécies de interesse (FRITZ; GJERDE, 2009; WEISS, 2016). Por simplicidade, no entanto, apenas um único ligante é considerado nas reações de equilíbrio químico que demonstram o efeito o uso de agentes complexantes (A_nLiG^{n-}) na eluição de íons de metais de transição nas reações (3) e (4). Quando uma solução contendo um íon de metal de transição de carga múltipla (M^{n+}) em baixa concentração e um cátion monovalente A^+ (Na^+ ou H^+) em uma concentração significativamente maior está em contato com um trocador de cátions na forma A^+ , o seguinte equilíbrio é estabelecido:



Reação 3.



Reação 4.

Resumidamente, quando agentes complexantes são adicionados à fase móvel, o mecanismo de eluição é um resultado da remoção isoiónica pelo contra-íon (efeito de “empurrar”) e pela formação de complexos (efeito de “puxar” pelos ligantes formadores de complexos), como demonstrado nas reações (3) e (4), respectivamente. O efeito de “puxar” ocorre em virtude da complexação parcial dos cátions, que resulta na redução da densidade da carga efetiva dos analitos e, em consequência disso, reduz a interação dessas espécies com os trocadores catiônicos da coluna cromatográfica. Além disso, as constantes de formação desses complexos são, geralmente, diferentes entre os cátions de metais de transição o que aumenta a seletividade da separação. Importante destacar que esses íons devem ser apenas parcialmente complexados pelo ligante selecionado, uma vez que a complexação completa pode resultar na perda de seletividade (HADDAD; JACKSON, 1990; WEISS, 2016). Esse mecanismo de separação tem sido amplamente explorado para a separação de cátions metálicos, como os metais de transição divalentes e os lantanídeos (FRITZ; GJERDE, 2009; WEISS, 2016).

Importante mencionar que, quando agentes complexantes são utilizados, além da avaliação da concentração desses reagentes, o pH também deve ser monitorado. O valor de pH da fase móvel, nesses casos, é o parâmetro experimental que determina a retenção de algumas espécies iônicas na fase estacionária, uma vez que afeta de maneira significativa as propriedades complexantes destas substâncias químicas. Em geral, a capacidade de complexação dos ligantes aumenta com o aumento do pH e o equilíbrio da reação (4) é deslocado para a direita, resultando na diminuição da retenção das espécies metálicas na fase estacionária (WEISS, 2016). No entanto, quando se almeja a determinação de íons de metais alcalinos, de metais alcalinos terrosos e de metais de transição em uma única corrida cromatográfica, o aumento do pH da fase móvel pode ocasionar a sobreposição de picos resultando na perda de seletividade. Portanto, especificamente nesses casos, o ajuste do pH deve ser realizado quando não é possível a separação de espécies iônicas através da otimização do tipo e concentração da fase móvel.

Em vista da importância da IC na determinação da concentração de espécies iônicas, aplicações desta técnica em diversas áreas têm sido amplamente discutidas em recentes publicações (MICHALSKI, 2009; BHATTACHARYYA; ROHRER, 2012; MORALES-RUBIO; DE LA GUARDIA, 2015). No entanto, deve-se destacar que a maioria dessas aplicações está relacionada a determinação de ânions, como as

espécies de Br (Br^- e BrO_3^-), Cl (Cl^- , ClO^- , ClO_2^- , ClO_3^- e ClO_4^-), F (F^-), I (I^- e IO_3^-), P (PO_4^{3-}), N (NO_3^- e NO_2^-) e S (SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , SCN^-). Segundo Morales-Rubio e De La Guardia (2015), que realizaram um levantamento das publicações em que a IC foi utilizada para análise de alimentos no período de 2001 a 2013, por exemplo, houve um crescimento do número total de artigos publicados nesse período. Apesar disso, quando são considerados apenas os artigos científicos que descrevem a IC para a determinação de cátions, percebe-se que esse crescimento não foi significativo. Além disso, apenas cerca de 10% do número de total de artigos científicos publicados neste período descrevem a determinação de cátions por IC (MORALES-RUBIO; DE LA GUARDIA, 2015). Embora existam algumas diferenças no perfil de publicações quando relacionamos o uso da IC para a análise de outras matrizes, como as matrizes ambientais, o uso da IC para a determinação de cátions ainda é visto como um desafio e é utilizada com menor frequência ao compararmos seu uso para a determinação de ânions nas mesmas matrizes.

Nesse contexto, destaca-se a determinação de íons de metais alcalinos e de metais alcalinos terrosos por IC-DC em uma única corrida cromatográfica em diversos tipos de matrizes (MICHALSKI, 2009). Pode-se dizer, que essa tem sido a principal aplicação da IC-DC nos últimos anos. Além disso, a IC-DC também tem sido aplicada para a determinação de íons de metais de transição. No entanto, estudos avaliando a determinação de íons desses três grupos de elementos em uma mesma corrida cromatográfica são escassos e consistem, basicamente, no desenvolvimento de métodos cromatográficos através do uso de soluções padrão e/ou matrizes aquosas (MICHALSKI, 2009; WEISS, 2016). No estudo de Zeng *et al.* (2006), por exemplo, os autores desenvolvem um método cromatográfico bastante promissor para a determinação de metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição utilizando um sistema compacto com eluição isocrática e detecção condutimétrica direta. Através do uso de uma mistura de agentes complexantes (MSA e ácido oxálico) como fase móvel e, como fase estacionária, uma coluna com resina sulfônica como trocador de cátions (250 mm X 4 mm d.i.), foi possível separar e determinar 11 cátions (Cu^{2+} , Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+}). Ensaio de recuperação utilizando solução padrão e matriz aquosa foram utilizados para avaliar a exatidão. Os autores relatam que o método apresentou exatidão e precisão adequadas. Além disso, os LODs variaram de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para Li^+ a $48 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ni^{2+} . Após avaliação dos parâmetros de mérito, o método foi aplicado para amostras de água mineral e cerveja,

as quais foram injetadas no sistema através do uso de seringas com filtros (0,45 µm). O trabalho desenvolvido por Zeng *et al.* (2006) é um exemplo dos poucos estudos que existem na literatura visando a determinação multielementar sequencial de íons dos metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição por IC-DC e, assim como comentado anteriormente, são aplicados para matrizes aquosas que dispensam a necessidade de uma etapa de preparo de amostras mais criteriosa.

Uma das principais razões da escassez de estudos nessa linha é a grande dificuldade de se obter seletividade e sensibilidade adequada para a determinação destes elementos por IC-DC. Outro problema frequente nesse tipo de análise é a determinação de baixas concentrações de íons de metais de transição na presença de elevadas concentrações de outros íons, como é observado na grande maioria das matrizes. Além disso, existe uma grande limitação do preparo de amostras para a determinação de cátions por IC-DC, pois na maioria dos casos os métodos de extração com soluções diluídas não são eficientes para a completa extração dessas espécies a partir de matrizes sólidas. Assim, é necessário o uso de métodos que consistem na eliminação da matriz, o que usualmente é realizado através do emprego de ácidos concentrados. Nesse sentido, as soluções resultantes requerem uma etapa de diluição previamente a sua injeção no sistema cromatográfico com o intuito de minimizar o efeito das elevadas concentrações de H⁺ em solução, o que na maioria dos casos inviabiliza a quantificação dos analitos.

A seguir serão apresentados alguns aspectos gerais sobre a etapa de preparo de amostras, bem como algumas das tendências para o preparo de amostras de matrizes sólidas a partir do uso de ácidos diluídos, com maior ênfase para a combustão iniciada por micro-ondas (MIC).

3.3 PREPARO DE AMOSTRAS

A etapa de preparo de amostras ainda é considerada como a mais importante dentro da sequência analítica, uma vez que é a responsável por tornar os analitos presentes em uma amostra passíveis de determinação. Importante ressaltar que a maioria dos equipamentos de determinação disponíveis atualmente, requerem que os elementos de interesse estejam presentes em uma solução adequada para a análise

(BARNES *et al.*, 2014). Ou seja, a matriz deve ser separada dos analitos ou destruída para que não ocorram interferências na análise – as quais podem gerar resultados inexatos – e não ocasionem danos aos equipamentos. Portanto, dependendo da matriz, essa etapa pode consumir demasiado tempo e, ainda, elevar os custos da análise (KRUG; ROCHA, 2016).

Existem diversos métodos de preparo de amostra descritos na literatura, os quais são muitas vezes classificados de acordo com fenômeno físico e/ou químico envolvido. A escolha do método de preparo de amostras irá depender de vários fatores, dentre os quais pode-se destacar o tipo de amostra, os elementos de interesse, a técnica de determinação e a faixa de concentração dos analitos. Dessa forma, é válido enfatizar que não existe um método de preparo de amostra universal e a seleção do método mais adequado para o propósito desejado ficará a critério do analista.

Quando a matriz da amostra é predominantemente orgânica, como no caso de alguns suplementos dietéticos, e os analitos encontram-se ligados aos constituintes da matriz, torna-se necessário destruir a matéria orgânica para que os analitos possam ser disponibilizados em uma solução própria para a determinação. Outra alternativa é o uso de métodos que envolvem, por exemplo, a extração dos analitos a partir do uso de soluções diluídas (geralmente água) e algum auxiliar como a agitação, a energia térmica branda ou até mesmo a energia ultrassônica. No entanto, as soluções resultantes, na maior parte das vezes, contêm elevadas concentrações de compostos da matriz além de não disponibilizarem quantitativamente os analitos em solução. Assim, dependendo da matriz, as soluções resultantes dos métodos de extração podem ser inadequadas para a determinação, mesmo após o *cleanup* da amostra. Os compostos da matriz que são extraídos podem promover interferências de diferentes naturezas, além de proporcionar danos aos equipamentos.

Acredita-se que seja por essa razão que os métodos mais utilizados para o preparo de amostras de suplementos dietéticos, de acordo com Quadro 1, são os métodos de digestão por via úmida em sistemas abertos ou fechados com aquecimento convencional ou micro-ondas na presença de ácidos inorgânicos concentrados (HIGHT *et al.*, 1993; WONG *et al.*, 1993; KRAMPITZ; BARNES, 1998; CHUANG *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2001; SOŁTYK *et al.*, 2003; RAMAN *et al.*, 2004; KREJČOVÁ *et al.*, 2006; GARCÍA-RICO *et al.*, 2007; SORIANO *et al.*, 2007a; SORIANO *et al.*, 2007b; ZACHARIADIS; OLYMPIOU, 2008; KHUDER *et al.*, 2009;

AVULA *et al.*, 2010; TUMIR *et al.*, 2010; AVULA *et al.*, 2011; TOKALIOĞLU, 2012; BU *et al.*, 2013; MARRERO *et al.*, 2013; KRAWCZYK, 2014; TOKALIOĞLU *et al.*, 2014; WAHEED *et al.*, 2014). Esses métodos são bastante eficientes para a digestão de uma grande variedade de amostras (KRUG; ROCHA, 2016). No entanto, deve-se enfatizar que os métodos que utilizam sistemas abertos apresentam algumas desvantagens quando comparados aos sistemas fechados como, por exemplo, o maior consumo de reagentes, a menor eficiência de digestão, a vulnerabilidade a contaminações pelo ambiente, o risco de perda de espécies voláteis, dentre outras. Com relação a forma de aquecimento, a radiação micro-ondas se destaca por reduzir de maneira considerável o tempo necessário para a completa digestão da amostra. Além disso, a maioria dos fornos micro-ondas disponíveis atualmente no mercado oferecem controle de temperatura e pressão, o que proporciona maior segurança ao analista. Portanto, a digestão por via úmida em sistemas fechados com aquecimento micro-ondas é uma das estratégias mais eficientes e vantajosas para eliminar a matriz da amostra e disponibilizar os analitos em soluções adequadas para a determinação.

No entanto, quando ácidos concentrados são utilizados na etapa de preparo da amostra, as soluções resultantes precisam ser diluídas para a introdução na maioria dos equipamentos, a fim de evitar interferências e danos. Nesse sentido, dependendo da técnica selecionada, a determinação de elementos em nível traço nesses digeridos pode ser inviável. Talvez seja por esse motivo que sejam tão escassos os trabalhos na literatura que combinam esses métodos de preparo de amostras com a determinação de metais por IC-DC, por exemplo. Assim, percebe-se a importância do desenvolvimento e avaliação de métodos alternativos de preparo de amostras que mantenham a eficiência de digestão, mas que substituam o uso de ácidos concentrados por soluções diluídas. Nesse sentido, deve-se dar destaque aos métodos de combustão iniciada por micro-ondas (MIC), de digestão assistida por radiação micro-ondas e radiação ultravioleta (MW-UV) e de digestão assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O₂). Esses métodos têm sido utilizados com sucesso para o preparo de uma grande variedade de matrizes sólidas, semi-sólidas e líquidas a partir do uso de soluções diluídas (BARIN *et al.*, 2014; BIZZI *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014).

Esses sistemas apresentam características que podem suprir as desvantagens dos métodos convencionais e permitir, por exemplo, a obtenção de soluções compatíveis a determinação por IC-DC. Um exemplo prático disso é apresentado no

trabalho de Crizel (2015), que avaliou o sistema de MW-O₂ para a digestão de amostras de suplementos esportivos visando a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Pb e Zn por ICP OES e S e P por IC. Nesse trabalho o autor conseguiu decompor uma massa consideravelmente elevada de amostra utilizando HNO₃ 5 mol L⁻¹ e 5 bar de pressão de O₂. Ao comparar os resultados do método proposto com os obtidos pelo método convencional utilizando MW-AD e HNO₃ concentrado, o autor torna evidente as vantagens que o uso de ácidos mais diluídos pode proporcionar. O autor destaca que os LODs utilizando a MW-O₂ foram sempre menores que os da MW-AD, sendo até cerca de 200 vezes menor para Cr, por exemplo. No entanto, não avalia a possibilidade de determinação de metais, como Cr, Cu e Zn, por IC.

Apesar de tudo, embora a MW-UV e a MW-O₂ permitam o uso de ácidos diluídos para o preparo de amostras, a eficiência de digestão ainda dependerá da concentração do ácido. Ou seja, nesses métodos a decomposição da matéria orgânica somente ocorrerá se houver uma quantidade mínima de um agente oxidante em contato com a amostra. Por sua vez, na MIC, a solução é usada com o único intuito de absorver os analitos que são liberados da matriz após sua decomposição pelo processo de combustão. A escolha dessa solução na MIC ocorre levando em consideração a sua capacidade em absorver/estabilizar/reter os analitos, ou seja, a seleção da solução absorvedora nos métodos de preparo de amostras que se baseiam na combustão da amostra é um parâmetro crucial para a recuperação quantitativa dos analitos (BARIN *et al.*, 2012). Dessa forma, em alguns casos, é possível usar soluções ainda mais diluídas quando comparadas as que são necessárias para a decomposição quando a MW-UV ou MW-O₂ são utilizadas. No trabalho desenvolvido por Barin *et al.* (2012), por exemplo, os autores desenvolveram um sistema de combustão iniciada por micro-ondas, usando radiação micro-ondas focalizada, para a decomposição de plantas visando a posterior determinação de Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni, Sr, V, e Zn por ICP OES. Usando apenas 10 mL de uma solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹ os autores obtiveram boas recuperações (de 93 a 98%) para Ca, Mg e Zn. Isso demonstra o potencial do uso da MIC para a decomposição de suplementos dietéticos visando a posterior determinação de metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição por IC-DC, a qual é bastante suscetível a análise de soluções ácidas. Assim, no item subsequente serão descritos os princípios básicos e algumas das características da MIC, que é o método de preparo que será avaliado para o preparo de amostras neste trabalho.

3.3.1 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)

A MIC é um dos métodos de preparo de amostras que mais tem se destacado nos últimos anos em virtude de suas inúmeras vantagens como, por exemplo, a excelente robustez no preparo de amostras contendo elevados teores de carbono (CHRISTOPHER; VETTER, 2016). Trata-se de um método de combustão, assim como a bomba de combustão e o frasco de Schöniger, ou seja, amostras de composição majoritariamente orgânicas são oxidadas pela ação direta do oxigênio promovendo a sua conversão em seus produtos de combustão (CO₂ e água) (ARRUDA, 2007). Contudo, possui diversas vantagens quando comparada a esses métodos, as quais a tornam o método de combustão mais eficiente para o preparo de amostras de composição majoritariamente orgânica e de difícil decomposição.

A MIC foi proposta inicialmente por Flores *et al.* (2004) e se destaca por combinar as vantagens dos métodos de combustão em sistema fechado com as vantagens dos métodos de digestão por via úmida com aquecimento assistido por radiação micro-ondas. Em vista disso, a MIC é adequada para o preparo de amostras visando à posterior determinação de metais e não metais, o uso de pequenos volumes de reagentes diluídos, a redução do tempo de preparo de amostra, a obtenção de baixos valores de carbono dissolvido em solução, além da eficiente decomposição de elevadas massas de amostra quando comparado a outros sistemas fechados (FLORES *et al.*, 2007). A possibilidade do uso de elevadas massas de amostra associada ao uso de ácidos diluídos resulta na obtenção de baixos valores de branco e, conseqüentemente, de reduzidos LODs, os quais possibilitam a determinação de elementos em concentrações bastante reduzidas. Além disso, deve-se salientar o fato da MIC estar de acordo com as tendências atuais de preparo de amostras, uma que vez necessita de pequenos volumes de reagentes diluídos e, em virtude disso, apresenta mínima geração de resíduos.

Em suma, a MIC consiste na combustão da amostra, de composição majoritariamente orgânica, em um frasco de quartzo fechado e com atmosfera enriquecida com oxigênio. Após a queima, é possível aplicar uma etapa de refluxo através do aquecimento da solução absorvedora pela radiação micro-ondas, proporcionando recuperações quantitativas dos analitos, bem como a obtenção de baixos desvios padrão relativos (RSD) (FLORES *et al.*, 2007). Dessa forma, os

analitos são absorvidos em uma solução adequada, selecionada de acordo com os analitos e a técnica de determinação a ser utilizada. Na Figura 2 é possível observar o sistema utilizado para a digestão de amostras através da MIC.

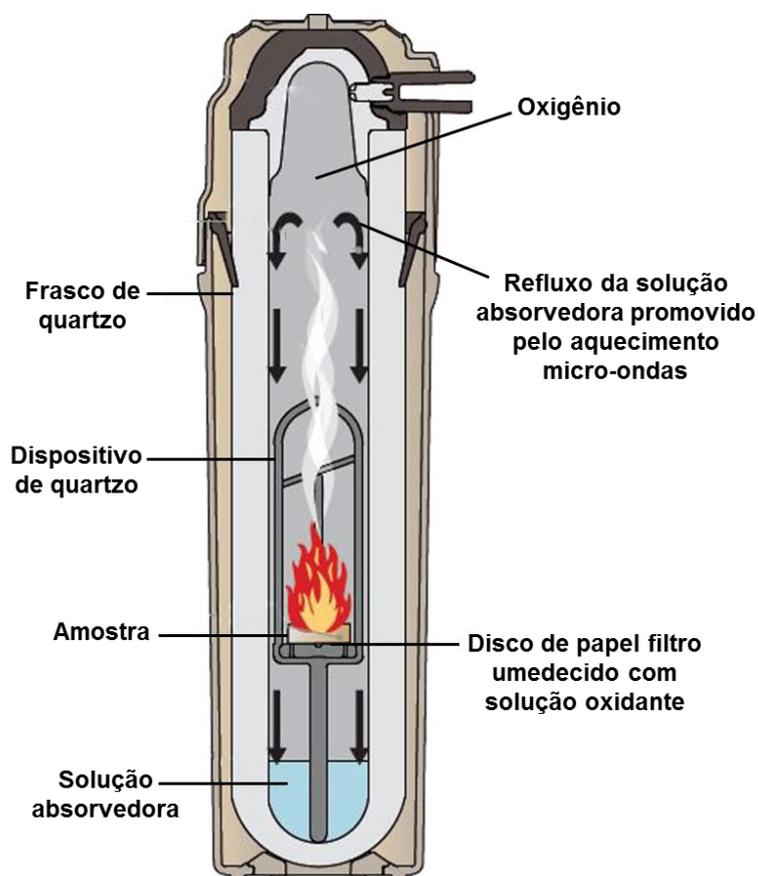


Figura 2. Sistema comercial utilizado para a decomposição de amostras por MIC sendo demonstrado a combustão de uma amostra e o refluxo da solução absorvedora promovido pelo aquecimento com micro-ondas (adaptado de *Microwave Reaction System for Sample Preparation*, Anton Paar. Disponível em: <<http://www.anton-paar.com>>).

Como pode ser observado na Figura 2, a amostra na forma de um comprimido é disposta sobre um dispositivo de quartzo contendo um disco de papel filtro previamente umedecido com uma solução ignitora. Embora NH_4NO_3 6 mol L^{-1} seja a solução ignitora comumente utilizada na MIC, existem trabalhos que demonstram que outras soluções como, por exemplo, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaNO_3 , KClO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KMnO_4 ou $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ também podem ser utilizadas (PEREIRA *et al.*, 2015a; PEREIRA *et al.*, 2016a). Além disso, vale ressaltar que a amostra também pode ser

preparada na forma de invólucros, envolvida por filme de polietileno ou outro material polimérico (COSTA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016b). O processo de ignição se dá através da interação da radiação micro-ondas com o disco de papel filtro umedecido com a solução ignitora que, após o aquecimento da solução, promove a oxidação do papel e gera a energia necessária para o início do processo de combustão da amostra. Durante a combustão, temperaturas superiores a 1000 °C são atingidas dependendo da matriz da amostra, assim como da massa utilizada (ARRUDA, 2007). Dessa forma, garante-se a conversão de quase toda a matéria orgânica em seus respectivos produtos de combustão.

Cabe enfatizar que a MIC, devido as suas características, foi aplicada para uma grande variedade de amostras como, por exemplo, alimentos (HARTWIG *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015; PICOLOTO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016), derivados do petróleo (PEREIRA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015b), fluoropolímeros, resíduos eletrônicos e elastômeros (MORAES *et al.*, 2010; FLORES *et al.*, 2013; MELLO *et al.*, 2015), dentre outras diversas aplicações. Portanto, a MIC pode ser uma ótima alternativa para o preparo de amostras de suplementos dietéticos. Além disso, em vista da possibilidade de escolha de uma solução absorvedora diluída, a MIC se torna adequada à determinação de metais por técnicas suscetíveis a interferências devido a concentração ácida, como a IC-DC. Ademais, possibilita a redução dos LODs, uma vez que minimiza ou até mesmo evita a necessidade de diluição das amostras previamente a determinação, o que é essencial para a quantificação de elementos em nível traço e ultra traço (FLORES *et al.*, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

O preparo das amostras de suplementos dietéticos foi realizado em um forno micro-ondas Multiwave 3000® (Anton Paar, Áustria) equipado com um rotor com capacidade para oito frascos e que dispõe de sensores que permitem medir a temperatura (individualmente) e a pressão média dos frascos em tempo real. Esse sistema possibilita o uso de frascos de politetrafluoretileno (PTFE)/perflúor (propil vinil éter) (TFM) e de quartzo para a digestão das amostras. No entanto, neste trabalho, foram utilizados apenas os frascos de quartzo (com volume interno de 80 mL) tendo em vista que suportam temperatura e pressão máxima de trabalho (300 °C e 80 bar, respectivamente) superiores a dos frascos de PTFE/TFM e, também, por possibilitarem a decomposição das amostras por MIC.

Para a decomposição das amostras por MIC, dispositivos de quartzo foram inseridos no interior de cada frasco, com o intuito de manter a amostra suspensa sobre a solução absorvedora. As condições máximas de temperatura, pressão e potência de operação utilizadas para a digestão das amostras por MIC foram, respectivamente, 280 °C, 80 bar e 1400 W. Na Figura 3 é possível observar o sistema utilizado para a digestão das amostras, bem como os acessórios adicionais empregados para a digestão por MIC, os quais se encontram disponíveis comercialmente (Anton Paar, Microwave Reaction System: Multiwave 3000®, Austria).

Nos procedimentos em que se fez necessária a determinação da massa de reagentes ou amostras, uma balança analítica (modelo AY220, Marte, Brasil) com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g foi utilizada.

A degaseificação das fases móveis avaliadas para a determinação dos analitos por cromatografia de íons, assim como a descontaminação dos papéis filtros, utilizados para a filtragem das amostras e como auxiliares de combustão, foram realizadas com o auxílio de um banho ultrassônico com frequência de 40 kHz (Unique, modelo USC – 2800 A, Brasil). A secagem de papéis filtros, filmes de polietileno e outros materiais que não podiam ser secos em estufa, foi realizada em uma capela de

fluxo laminar classe 100 (modelo CSLH-12, Veco, Brasil). As vidrarias, os reagentes e as amostras foram secas em estufa convencional (modelo 400/2ND, De Leo, Brasil).

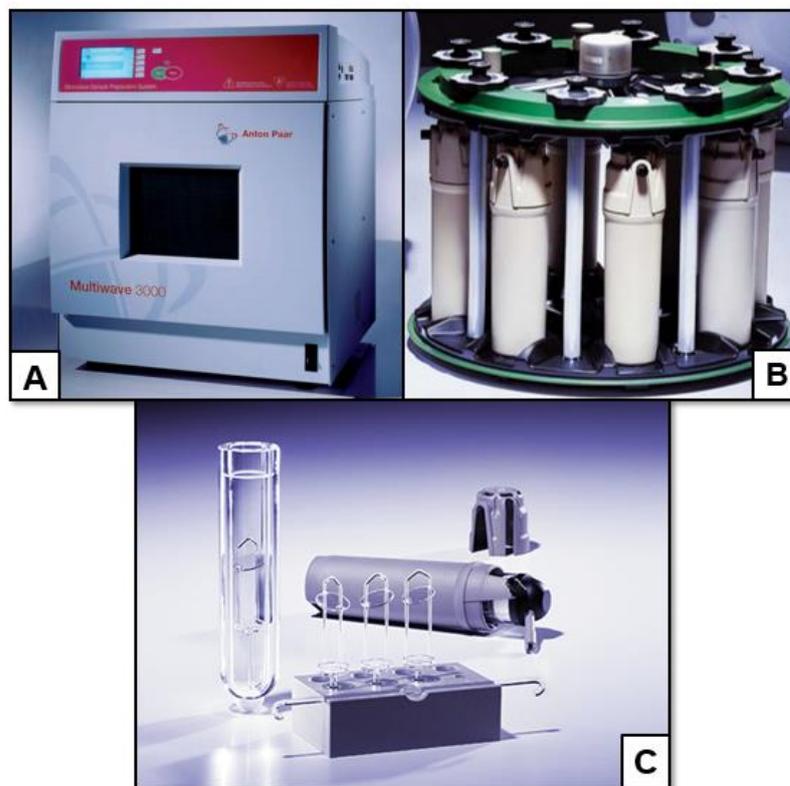


Figura 3. Sistema utilizado para o preparo das amostras de suplementos dietéticos: A) Forno de micro-ondas Multiwave 3000®; B) rotor equipado com oito frascos; C) frasco de quartzo e dispositivo de quartzo para MIC (adaptado de *Microwave Reaction System: Multiwave 3000®*, Anton Paar. Disponível em: <<http://www.anton-paar.com>>).

A determinação dos analitos foi efetuada em um cromatógrafo de íons compacto (modelo 861 Advanced Compact IC, Metrohm, Suíça) equipado com uma bomba isocrática e detecção condutimétrica direta, ou seja, sem a presença de um módulo de supressão química. Para a separação dos analitos no sistema cromatográfico, utilizou-se uma coluna de troca catiônica com grupos carboxila suportados em sílica gel, modelo Metrosep C4 (150 x 4 mm d.i., com partículas de 5 μ m de diâmetro, Metrohm). Adicionalmente, a determinação de metais nos digeridos foi realizada em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha), equipado

com sistema de nebulização pneumático tipo *cross-flow* e câmara de nebulização de duplo passo.

4.2 REAGENTES

Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 M Ω cm), a qual foi obtida a partir de um sistema de purificação (Megapurity, Coreia do Sul). Ademais, todos os reagentes utilizados neste trabalho apresentavam grau analítico ou elevada pureza.

As soluções de HNO₃ utilizadas para o preparo das amostras, bem como para diluição de padrões e amostras, foram preparadas a partir de HNO₃ p.a. 65% (m/m) (Sigma-Aldrich Inc., Alemanha), destilado em um sistema abaixo do ponto de ebulição (modelo duoPUR® 2.01E, Milestone, Itália). Além disso, uma solução de nitrato de amônio (NH₄NO₃) 6 mol L⁻¹, preparada a partir da dissolução do sal correspondente (Merck, Alemanha) em água, foi utilizada como solução iniciadora da combustão no preparo das amostras por MIC. Oxigênio com pureza de 99,5% (Linde, Brasil), foi utilizado para a pressurização dos frascos de quartzo utilizados para o preparo das amostras por MIC.

Soluções de ácido tartárico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido dipicolínico (DPA) e HNO₃ foram avaliadas como fases móveis na cromatografia de íons. Essas soluções foram preparadas a partir da diluição de soluções com concentrações intermediárias. As soluções de ácido tartárico 500 mmol L⁻¹, ácido oxálico 500 mmol L⁻¹ e ácido cítrico 500 mmol L⁻¹ foram preparadas a partir da dissolução do reagente sólido ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich Inc.) em água. Uma solução de HNO₃ 500 mmol L⁻¹ foi preparada a partir da diluição de HNO₃ p.a. 65% (m/m) em água, enquanto que uma solução comercial de DPA 0,02 mol L⁻¹ (fase móvel concentrada para IC – COD.: 50972/ LOT.: BCBN7150V – Sigma-Aldrich Inc.) foi utilizada. O uso de um modificador químico na fase móvel também foi avaliado e, para isso, acetonitrila (grau HPLC $\geq 99,99\%$, JT Baker, Holanda) foi utilizada. A neutralização das amostras, quando necessário, foi realizada a partir do uso de uma solução de LiOH 500 mmol L⁻¹, a qual foi preparada pela dissolução do reagente sólido (Sigma-Aldrich Inc.) em água.

As curvas de calibração para a determinação de metais alcalinos (K, Li e Na), metais alcalinos terrosos (Ca e Mg) e metais de transição (Co, Mn e Zn) por IC-DC (0,1 a 10 mg L⁻¹, com pelo menos 5 níveis de concentração) foram preparadas a partir da diluição sequencial de soluções padrão monoelementares contendo 1000 mg L⁻¹ dos analitos (Specsol, QuimLab, Brasil) em água. Por outro lado, as curvas de calibração para a determinação dos analitos por ICP OES (5 a 100 µg L⁻¹, com pelo menos 7 níveis de concentração) foram preparadas a partir da diluição de uma solução de referência multielementar contendo 10 mg L⁻¹ dos analitos (SCP33MS, SCP Science, Canadá) em HNO₃ 5% (v/v). Na determinação dos analitos por ICP OES, argônio de elevada pureza (99,998%, White Martins) foi utilizado para gerar e manter o plasma. Para a realização dos ensaios de recuperação, soluções padrão monoelementares de Ca (50 g L⁻¹), Co (10 g L⁻¹), K (50 g L⁻¹), Li (2,5 g L⁻¹), Mg (50 g L⁻¹), Mn (10 g L⁻¹), Na (100 g L⁻¹) e Zn (10 g L⁻¹) foram usadas. Essas soluções foram preparadas a partir da dissolução de Ca(NO₃)₂.4H₂O (Dinâmica, Brasil), Co(NO₃)₂.6H₂O (Dinâmica), KNO₃ (Merck), LiNO₃ (Dinâmica, Brasil), Mg(NO₃)₂.6H₂O (Dinâmica), Mn(NO₃)₂.4H₂O (Merck), NaNO₃ (Synth, Brasil) e Zn(NO₃)₂.6H₂O (Vetec, Brasil) em HNO₃ 0,1% (v/v) ou água, no caso dos sais de K e Na.

A descontaminação da vidraria e dos materiais utilizados neste trabalho foi realizada a partir do uso de uma solução 10% (v/v) de HNO₃, que foi preparada a partir da diluição do reagente concentrado (Vetec). Também foi utilizado álcool etílico absoluto (Vetec) em alguns procedimentos de descontaminação.

4.3 PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO

As vidrarias e outros materiais comuns de laboratório foram descontaminados por imersão em HNO₃ 10% (v/v), por um período aproximado de 24 h. Por sua vez, os papéis filtro, utilizados como auxiliares na combustão das amostras por MIC e nos procedimentos de filtragem, assim como os filmes de polietileno, usados para envolver as amostras para a digestão por MIC, foram descontaminados por imersão em álcool etílico 20% (v/v) por 20 min em banho ultrassônico. Cabe salientar que todos os materiais e vidrarias foram, posteriormente, lavados com água ultrapura e secos em capela de fluxo laminar.

Os frascos de quartzo, assim como os dispositivos de quartzo utilizados como suporte das amostras no sistema de MIC, foram descontaminados com HNO₃ concentrado sob aquecimento em forno de micro-ondas. O programa de irradiação com micro-ondas utilizado nesse procedimento consistiu no aquecimento da solução a 1400 W por 10 min seguida de uma etapa de resfriamento (0 W por 20 min).

4.4 AMOSTRAS

Para a realização dos experimentos, suplementos dietéticos foram adquiridos no comércio local de Pelotas – RS. As amostras foram classificadas de acordo com a composição, assim como descrito por Mason (2007), em: suplementos hipercalóricos (SHP: SHP-1, SHP-2, SHP-3, SHP-4 e SHP-5), suplementos multivitamínicos/minerais (SMVM: SMVM-1, SMVM-2 e SMVM-3) e suplementos botânicos (SB: SB-1, SB-2, SB-3 e SB-4). Apesar de todos os produtos serem denominados de suplementos dietéticos, existem diferenças consideráveis na composição desses produtos. Esse fato demonstra as dificuldades que foram encontradas neste trabalho na tentativa de estabelecer uma única condição de preparo de amostras que possibilitasse a determinação dos analitos por IC-DC nessa variedade de matrizes. No Quadro 2 são apresentadas algumas informações referentes a composição e forma de apresentação (pó, comprimido ou cápsula) das amostras adquiridas, as quais foram obtidas das embalagens dos produtos.

Importante mencionar que aproximadamente 100 g de todas as amostras, independentemente de sua forma de apresentação foram, previamente ao início dos experimentos, homogeneizadas e secas em estufa por 4 h a 50 ± 5 °C. As amostras que se apresentavam na forma de pó foram homogeneizadas com o auxílio de gral e pistilo até a obtenção um pó fino (menor que 80 *mesh* ou 180 μ m), o qual foi submetido a uma etapa de peneiramento para garantir a homogeneidade de todas as amostras. Os suplementos dietéticos que se apresentavam na forma de cápsulas tiveram seu conteúdo removido, enquanto que suplementos na forma de comprimidos foram macerados até a obtenção de um pó, o qual foi submetido a etapa de homogeneização e secagem, assim como descrito anteriormente.

Quadro 2. Resumo das amostras adquiridas e respectivos ingredientes informados nos rótulos dos produtos.

AMOSTRAS	PRINCIPAIS INGREDIENTES INFORMADOS NOS RÓTULOS	FORMA DE APRESENTAÇÃO
SHP-1	Maltodextrina, mistura de proteínas (clara de ovo, trigo, soro de leite, dentre outras), glucose, frutose, caseinato de cálcio, cacau em pó, triglicerídios de cadeia média, vitaminas e minerais.	Pó
SHP-2	Maltodextrina, mistura de proteínas (soro de leite, soja, claro de ovo, trigo), glucose, frutose, concentrado de uva desidratado, caseinato de cálcio, corante natural de beterraba, vitaminas e minerais.	Pó
SHP-3	Maltodextrina, dextrose, mistura de proteínas (soro de leite, soja, dentre outras), colágeno hidrolisado, composto lácteo, frutose, fruto-oligossacarídeo, minerais e vitaminas.	Pó
SHP-4	Maltodextrina, proteína concentrada do leite, frutose, colágeno hidrolisado, vitaminas, minerais, antiumctantes e corante natural de beterraba.	Pó
SHP-5	Maltodextrina, dextrose, mistura de proteínas (ovo, soro de leite, soja, trigo, soja, dentre outras) leite em pó desnatado, minerais, Vitaminas, colágeno, emulsificante, ácido cítrico e corantes artificiais.	Pó
SB-1	Extrato de <i>Paullinia cupana</i> (guaraná) enriquecido com minerais (Ca, Mg, Mn e Zn).	Cápsula
SB-2	Extrato de <i>Cynara scolymus L</i> (alcachofra) enriquecido com minerais (Ca, Mg, Mn e Zn).	Cápsula
SB-3	Extrato de <i>Cynara scolymus L</i> (alcachofra) e derivados do ácido cafeoilquínico.	Cápsula
SB-4	Extrato de <i>Paullinia cupana</i> (guaraná) e cafeína.	Cápsula

(continuação)

AMOSTRAS	PRINCIPAIS INGREDIENTES INFORMADOS NOS RÓTULOS	FORMA DE APRESENTAÇÃO
MVM-1	Fosfato dicálcio, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, vitamina C, fumarato ferroso, vitamina E, nicotinamida, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, vitamina A, vitamina B12, vitamina D3, mononitrato de tiamina, cloridrato de piridoxina, vitamina K, riboflavina, sulfato de cobre, ácido fólico, molibdato de sódio, selênio de sódio, iodeto de potássio, biotina, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, polietilenoglicol, estereato de magnésio e dióxido de silício.	Comprimido
MVM-2	Vitamina C, pirofosfato de ferro, vitamina E, sulfato de zinco, nicotinamida, pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, vitamina A, sulfato de cobre, vitamina D, cloridrato de piridoxina, mononitrato de tiamina, riboflavina, ácido fólico, biotina, selenito de sódio e vitamina B12, celulose microcristalina, dióxido de silício, dióxido de titânio e corantes artificiais.	Cápsula
MVM-3	Fosfato dicálcio, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, vitamina C, fumarato ferroso, vitamina E, nicotinamida, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, betacaroteno, sulfato de manganês, biotina, vitamina A, vitamina D, vitamina K, cloridrato de piridoxina, riboflavina, mononitrato de tiamina, sulfato de cobre, ácido fólico, vitamina B12, cloreto de cromo, lactose, molibdato de sódio, selenato de sódio, iodeto de potássio, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, polivinilpirrolidona insolúvel, dióxido de titânio, dióxido de silício e corantes artificiais.	Comprimido

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS SULFATADAS

O teor de cinzas sulfatadas das amostras selecionadas para a otimização dos métodos de preparo de amostras (SHP-1, SMVM-1 e SB-1) foi determinado de acordo com o método descrito na 5ª Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). Essa determinação foi realizada com o intuito de identificar a porção inorgânica das amostras e, com isso, auxiliar na seleção das melhores condições de preparo de amostras.

Para isso, aproximadamente 2 g de suplemento dietético, previamente homogeneizado e seco, foram transferidos para cadinhos de porcelana calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, cerca de 1 mL de H₂SO₄ foi adicionado e as amostras foram aquecidas até a carbonização em temperatura não superior a 600 ± 50 °C. Em seguida, após o arrefecimento dos cadinhos, cerca de 1 mL de H₂SO₄ foi novamente adicionado para umedecer o resíduo que foi, então, carbonizado e incinerado com aquecimento gradativo até 600 ± 50 °C durante o tempo necessário para a obtenção de cinzas de coloração branca ou próxima. Posteriormente, as amostras foram pesadas e submetidas novamente a aquecimento até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse maior que 0,5 mg.

A incineração e carbonização das amostras foi realizada em um forno mufla modelo 1C.318.24 (Quimis, Brasil) e os resultados foram expressos em porcentagem da massa inicialmente utilizada para esta determinação. Importante mencionar que esses experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 PREPARO DE AMOSTRAS

Neste trabalho, a MIC foi avaliada para o preparo de amostras de suplementos dietéticos visando à subsequente determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição por IC-DC. Adicionalmente, as amostras foram digeridas por MW-AD, assim como descrito em outros estudos, com o intuito de se obter valores de referência. Assim, nos itens subsequentes – 4.6.1 Combustão iniciada por micro-

ondas (MIC) e 4.6.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) – bem como na Figura 4, são apresentados detalhes dos procedimentos utilizados.

4.6.1 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)

Tendo em vista que os suplementos dietéticos selecionados para o desenvolvimento deste trabalho foram divididos em três categorias, de acordo com sua composição majoritária, o preparo dessas amostras por MIC foi avaliado para cada matriz. Os parâmetros comumente avaliados durante o preparo de amostras por MIC são a massa de amostra, a composição e a concentração da solução absorvedora e o tempo de refluxo no programa de irradiação com micro-ondas (PEREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011). Nesse sentido, uma amostra de cada categoria de suplemento dietético (hipercalórico, SHP-1; multivitamínico/mineral, SMVM-1 e botânico, SB-1) foi selecionada aleatoriamente para a realização desses estudos. Na Figura 4 são apresentados os parâmetros avaliados para cada uma dessas categorias.

Para a introdução das amostras no sistema de decomposição por MIC, filmes de polietileno (com dimensões de 8 x 8 cm, massa de aproximadamente 50 mg) foram utilizados para envolvê-las. O filme de polietileno foi fechado com auxílio de uma pinça, selado por aquecimento e colocado na base de um suporte de quartzo, o qual continha um disco de papel filtro umedecido com 50 µL de uma solução de NH_4NO_3 6 mol L⁻¹. Após isso, o dispositivo de quartzo foi introduzido em um frasco de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora. Em seguida, os frascos foram cuidadosamente fechados, fixados no rotor, pressurizados com 20, 25 ou 30 bar de O_2 e submetidos a aquecimento em forno micro-ondas sob o seguinte programa de irradiação: *i*) 1400 W por 1 min (etapa de ignição); *ii*) 0 W por 1 min (etapa de combustão); *iii*) 1400 W por 5, 10 ou 15 min (etapa de refluxo) e *iv*) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento).

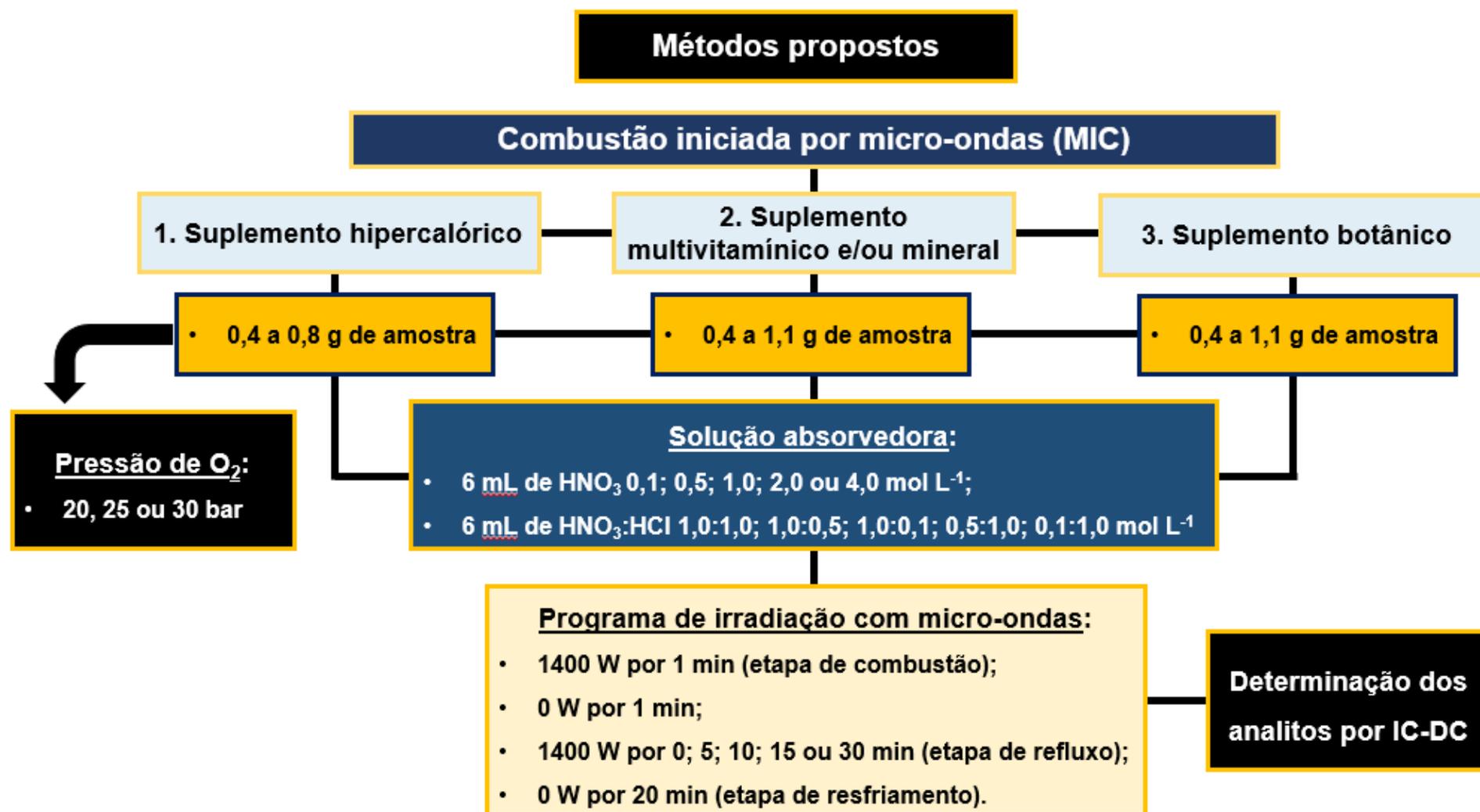


Figura 4. Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de suplemento hipercalórico, botânico e multivitamínico/mineral por MIC para a subsequente determinação metais por IC-DC.

A taxa de aumento de pressão, a temperatura máxima e a pressão máxima foram fixadas em $0,8 \text{ bar s}^{-1}$, $280 \text{ }^\circ\text{C}$ e 80 bar , respectivamente. As soluções resultantes foram filtradas, transferidas para frascos volumétricos de 25 mL e o volume final foi aferido com água ultrapura. A determinação dos analitos foi realizada por IC-DC e, adicionalmente, por ICP OES para comparação dos resultados. Cabe destacar que a pressão de O_2 , a massa de papel filtro, assim como a concentração da solução oxidante utilizada como iniciadora da combustão e o volume dessa solução utilizado para umedecer o papel filtro foram baseados em trabalhos anteriores (FLORES *et al.*, 2004; MESKO, 2008).

4.6.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

Como demonstrado no Quadro 1, a maioria dos métodos analíticos descritos atualmente para a determinação de metais em suplementos dietéticos consistem no preparo da amostra utilizando reagentes concentrados e posterior determinação desses elementos por técnicas espectrométricas. Dessa forma, as amostras de suplementos dietéticos utilizadas para a otimização dos métodos propostos neste trabalho (SHP-1, SB-1 e SMVM-1) foram, adicionalmente, digeridas por MW-AD.

Para isso, aproximadamente $0,5 \text{ g}$ de suplemento dietético foram transferidos para frascos de digestão e 6 mL de HNO_3 concentrado foram adicionados. Após a adição de HNO_3 as amostras foram deixadas em repouso em uma capela de exaustão durante 10 minutos. Posteriormente, os frascos foram fechados, fixados ao rotor e submetidos ao seguinte programa de irradiação com micro-ondas: i) rampa de 10 min até 800 W ; ii) 20 min a 800 W e iii) 20 min a 0 W (resfriamento). Para esse experimento, a taxa de aumento de pressão, a temperatura máxima e a pressão máxima foram fixadas em $0,3 \text{ bar s}^{-1}$, $280 \text{ }^\circ\text{C}$ e 80 bar , respectivamente. As soluções resultantes foram transferidas para frascos volumétricos de 25 mL e o volume final foi aferido com água ultrapura. Esse método foi adaptado de alguns estudos relatados na literatura em que suplementos dietéticos são digeridos em sistemas fechados, com radiação micro-ondas e utilizando HNO_3 concentrado como solução digestora (SOŁTYK *et al.*, 2003; KREJČOVÁ *et al.*, 2006; MARRERO *et al.*, 2013; CRIZEL, 2015).

4.7 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR

A determinação dos analitos foi realizada por IC-DC e por ICP OES. A IC-DC foi utilizada para análise apenas dos digeridos oriundos da MIC, enquanto que a ICP OES foi utilizada para a análise das soluções oriundas do preparo das amostras por MIC e MW-AD. Os parâmetros instrumentais relativos à determinação dos analitos por ICP OES estão descritos na Tabela 2. Esses parâmetros foram selecionados de acordo com as recomendações do fabricante do equipamento.

Tabela 2. Parâmetros operacionais para a determinação elementar por ICP OES.

Parâmetros	Condições operacionais
Potência do gerador de RF (W)	1400
Vazão de argônio (L min ⁻¹)	
Plasma	14,0
Auxiliar	1,0
Nebulizador	1,0
Linhas de emissão (nm)*	396,847 Ca (II); 230,786 Co (II); 766,491 K (I); 670,780 Li (I), 280.270 Mg (II), 259.373 Mn (II), 589.592 Na (I) e 213.856 Zn (I)

* (I) linhas atômicas e (II) linhas iônicas

Por outro lado, fez-se necessário a realização de alguns estudos para possibilitar a adequada determinação dos analitos por IC-DC. Inicialmente, realizou-se a avaliação da fase móvel levando em consideração os analitos e a fase estacionária disponível para a realização do presente estudo. Posteriormente, a influência da acidez residual na determinação dos analitos foi avaliada. Os detalhes referentes a essas avaliações são apresentados nos itens a seguir (4.7.1 Cromatografia de íons: Avaliação da fase móvel para a determinação de metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição e 4.7.2 Influência da acidez residual na determinação por IC-DC).

4.7.1 Cromatografia de íons: Avaliação da fase móvel para a determinação de metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e metais de transição

A avaliação da fase móvel para a determinação dos íons de metais alcalinos (K^+ , Li^+ e Na^+), metais alcalinos terrosos (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e metais de transição (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}) por IC-DC, foi realizada levando em consideração as recomendações do fabricante da coluna cromatográfica, bem como estudos relatados na literatura que avaliaram a eficiência de uma série de substâncias na eluição desses metais, de acordo com a coluna cromatográfica utilizada (EITH *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2006; CALAND *et al.*, 2012). Como foi destacado no item 3.2.2.1 (Fundamentos e aplicações em IC), a separação dessas três classes de elementos não é uma tarefa simples e, dependendo da coluna cromatográfica, necessita de uma criteriosa avaliação com o intuito de possibilitar a adequada separação de todas as espécies em tempos de corrida relativamente curtos. A coluna cromatográfica utilizada neste trabalho é indicada, de acordo com o fabricante, para a separação de metais alcalinos e metais alcalinos terrosos, e a fase móvel recomendada para essa separação consiste em uma mistura de HNO_3 ($1,7 \text{ mmol L}^{-1}$) e DPA ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Portanto, inicialmente, essa solução foi avaliada para a separação dos analitos.

Posteriormente, ácidos orgânicos fracos, como o ácido cítrico ($4,0$ a $12,0 \text{ mmol L}^{-1}$), ácido tartárico ($2,0$ a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) ou ácido oxálico ($0,5$ a $3,0 \text{ mol L}^{-1}$), também foram avaliados para a eluição dos analitos. Adicionalmente, avaliou-se o uso de HNO_3 (até 1 mmol L^{-1}) misturado ao ácido orgânico que possibilitou a obtenção dos melhores resultados. Por fim, com o intuito de melhorar a resolução dos picos cromatográficos e reduzir o tempo de análise, o uso de acetonitrila como um modificador químico da fase móvel foi avaliado.

Cabe salientar que todas as soluções avaliadas como fase móvel foram previamente sonicadas em banho ultrassônico por 20 min. Além disso, a vazão da fase móvel (que variou de $0,7$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) foi avaliada. Assim, após a estabilização da linha base, quando efetuada a substituição da fase móvel a ser avaliada, soluções padrão monoelementares dos analitos na concentração de 5 mg L^{-1} foram injetadas individualmente no sistema cromatográfico, afim de avaliar o tempo de retenção para cada analito. Após a identificação do tempo de retenção para cada espécie, um padrão multielementar foi injetado e, em casos específicos, a qualidade de separação dos

picos cromatográficos foi verificada a partir de parâmetros cromatográficos como a seletividade (α), a resolução cromatográfica (R) e o fator de capacidade (K), assim como descrito na literatura (WEISS, 2016).

4.7.2 Influência da acidez na determinação de metais por IC-DC

Para a realização desse estudo, padrões multielementares – contendo Ca^{2+} ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$); Co^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); K^+ ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$); Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); Mg^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); Mn^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); Na^+ ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) e Zn^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) – foram preparados em água ou concentrações crescentes de HNO_3 (5; 10; 15; 20 ou 25 mmol L^{-1}). Esses padrões foram preparados a partir da diluição de padrões monoelementares (1000 mg L^{-1}), assim como apresentado no item 4.2 Reagentes, no qual é descrito o preparo das curvas de calibração. Após a análise dos padrões sob as condições cromatográficas previamente otimizadas, utilizando curvas de calibração preparadas em água, uma análise estatística foi realizada com o intuito de verificar se as concentrações dos analitos eram afetadas devido as concentrações crescentes de HNO_3 em solução. O aspecto dos picos cromatográficos também foi levado em consideração nesse estudo.

4.8 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DOS MÉTODOS PROPOSTOS

Os parâmetros de mérito avaliados neste trabalho foram a exatidão, a precisão, os LODs e LOQs. Adicionalmente, a faixa linear de trabalho também foi avaliada através dos coeficientes de determinação.

A exatidão dos métodos propostos foi avaliada através da realização de ensaios de recuperação com solução padrão e pela comparação dos resultados com os obtidos a partir de um método de referência. Os ensaios de recuperação foram realizados em dois níveis de concentração para cada matriz avaliada (suplemento hipercalórico, suplemento botânico e suplemento multivitamínico/mineral): 50% e 100% da concentração dos analitos quantificados nas amostras ou o LOQ e 2LOQ

quando não quantificados (ANVISA, 2017). Para a realização desses ensaios, soluções padrão contendo os analitos foram adicionadas à amostra previamente ao fechamento dos invólucros, os quais foram submetidos a decomposição, assim como foi apresentado no item 4.5.1 Combustão Iniciada por Micro-ondas (MIC). Além disso, um método de referência – descrito no item 4.6.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) – foi utilizado para a obtenção de valores de referência para as amostras SHP-1, SMVM-1 e SB-1. Assim, a concordância entre os resultados obtidos através dos métodos propostos e os valores adotados como referência também foi utilizada para avaliar a exatidão. A repetibilidade e reprodutibilidade – realizada em dias diferentes e por analistas distintos – foi determinada pelo RSD dos experimentos usados para avaliar a exatidão.

Os LODs e LOQs foram calculados a partir da média dos valores de branco e do desvio padrão obtido após a análise de pelo menos 10 replicatas (INMETRO, 2016). Importante mencionar que, quando não observada variação no sinal analítico para análise do branco analítico do procedimento, concentrações crescentes de solução padrão dos analitos foram adicionadas visando à obtenção de uma variação do sinal analítico que possibilitasse a determinação desses parâmetros. Além disso, o volume final dos digeridos, a massa de amostra, bem como o fator de diluição requerido para a determinação dos analitos foram considerados. A Equação 1 e a Equação 2 apresentam as fórmulas utilizadas para o cálculo do LOD e LOQ, respectivamente.

$$LOD = \left\{ \frac{[(3S + \bar{x}) \times V_{afirmação}]}{massa\ de\ amostra} \right\} \times Fator\ de\ diluição$$

Equação 1.

$$LOQ = \left\{ \frac{[(10S + \bar{x}) \times V_{afirmação}]}{massa\ de\ amostra} \right\} \times Fator\ de\ diluição$$

Equação 2.

Importante mencionar que todos os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ou pelo teste *t* de Student utilizando o *software* GraphPad InStat 3.00 (GraphPad, USA).

4.9 APLICABILIDADE DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS POR IC-DC

Após a avaliação dos parâmetros de mérito, os métodos propostos foram aplicados para 5 amostras de suplemento hipercalórico, 3 amostras de suplemento multivitamínico/mineral e 4 amostras de suplemento botânico, totalizando 12 amostras. Os resultados obtidos foram comparados com os valores informados nos rótulos dos produtos, quando disponível.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS SULFATADAS

A determinação do teor de cinzas foi realizada nos suplementos dietéticos utilizados para a otimização da MIC no preparo das amostras (SHP-1, SMVM-1 e SB-1). Cabe enfatizar a importância dessa avaliação, uma vez que as condições de preparo de amostra – como a massa e a solução absorvedora – podem ser estabelecidas de acordo com a composição majoritária de cada suplemento. Matrizes com elevados teores de constituintes inorgânicos, por exemplo, têm sido eficientemente preparadas por MIC somente quando espécies voláteis, as quais são separadas da matriz, são determinadas (PEREIRA *et al.*, 2016b; PEREIRA *et al.*, 2017; NOVO *et al.*, 2018). Por outro lado, matrizes de composição majoritariamente orgânica têm sido amplamente decompostas por MIC para a determinação elementar, o que inclui os metais, os não metais e os metalóides (BARIN *et al.*, 2014). Os resultados referentes a determinação do teor de cinzas sulfatadas em suplementos dietéticos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teor de cinzas sulfatadas em amostras de suplemento hipercalórico, botânico e multivitamínico/mineral (média \pm desvio padrão, n = 3).

Amostra	Tipo	Teor de cinzas sulfatadas (%)
SHP-1	Hipercalórico	1,10 \pm 0,01
SMVM-1	Mineral	49,7 \pm 0,1
SB-1	Botânico	3,85 \pm 0,02

Como pode ser observado, dentre os suplementos dietéticos avaliados, o suplemento hipercalórico apresentou o menor teor de cinzas (~1%). Como mencionado, os suplementos hipercalóricos são ricos em carboidratos e/ou proteínas, e a adição de vitaminas e/ou minerais nesses suplementos ocorre pontualmente, uma vez que esses produtos não são destinados para a suplementação de minerais. Essa poderia ser a explicação do baixo teor de cinzas observado para essa amostra. Por sua vez, o teor de cinzas do suplemento botânico (~4%) foi similar aquele obtido para

o suplemento hipercalórico. Assim como para o suplemento hipercalórico, a adição de vitaminas e/ou minerais nesses produtos também ocorre em casos específicos e o teor de cinzas determinado deve estar, provavelmente, relacionado aos constituintes inorgânicos presentes na matriz da planta utilizada para a produção deste suplemento. Importante mencionar que plantas geralmente contêm concentrações consideráveis de Ca, Mg e outros minerais, o que explicaria o maior teor de cinzas para essa amostra quando comparada ao suplemento hipercalórico (BIZZI *et al.*, 2011b; BARIN *et al.*, 2012). Por outro lado, o teor de cinzas do suplemento multivitamínico/mineral foi consideravelmente superior (~50%). Pode-se relacionar esse elevado teor de constituintes inorgânicos com as informações descritas no rótulo do produto, que descreve o uso de diversos sais inorgânicos, bem como de óxidos. Contrariamente aos suplementos dietéticos SHP-1 e SB-1, os suplementos minerais se destinam a suplementação de minerais e, provavelmente, por isso a composição desses suplementos apresenta uma considerável porção inorgânica. A porção orgânica desse suplemento pode estar relacionada ao uso de excipientes e outras substâncias orgânicas, as quais conferem características específicas a esses produtos.

Com base nessas informações é possível verificar, por exemplo, que o suplemento mineral pode necessitar de estudos adicionais após a queima da fração orgânica por combustão visando garantir a recuperação quantitativa dos analitos contidos na porção inorgânica que, como demonstrado, é consideravelmente elevada na amostra utilizada para otimização. A avaliação do uso de agentes complexantes como o HCl, assim como do programa de irradiação (tempo de refluxo) podem ser estratégias interessantes (PEREIRA *et al.*, 2011). Por outro lado, tendo em vista os baixos teores de cinzas determinados nas amostras SHP-1 e SB-1, espera-se que a MIC seja eficiente para o preparo dessas amostras. Assim como esperado, a determinação do teor de cinzas permitiu a obtenção de informações que serão de grande valia para a otimização da MIC no preparo de amostras de suplementos dietéticos e posterior determinação de metais por IC. Além disso, enfatiza-se a grande variação na composição das matrizes e, com isso, as dificuldades que serão encontradas para se estabelecer um método que possibilite a determinação de metais em suplementos hipercalóricos, botânicos e multivitamínicos e/ou minerais.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS POR IC-DC

A seguir serão apresentados os resultados relativos à otimização cromatográfica, a qual foi realizada com o intuito de possibilitar a determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição em uma mesma corrida cromatográfica a partir do uso de um sistema com detecção condutimétrica direta. Vale ressaltar que a coluna cromatográfica utilizada nesse estudo é recomendada para a separação de íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos, como comentado anteriormente, e, portanto, fez-se necessário a realização de alguns estudos visando à eluição e separação adicional de íons de metais de transição, como o Co, Cu, Fe, Mn e Zn. Para isso, a composição e concentração da fase móvel, bem como a sua vazão foram criteriosamente avaliados. Além disso, a influência da acidez foi avaliada na determinação dos analitos por IC-DC, uma vez que a técnica é extremamente suscetível a interferências relacionadas a concentrações de íons H^+ em solução.

5.2.1 Avaliação da composição, concentração e vazão da fase móvel

De acordo com as informações descritas pelo fabricante da coluna cromatográfica que foi utilizada neste trabalho, apenas Ca^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Na^+ e NH_4^+ são eficientemente separados utilizando a fase móvel recomendada. Mesmo assim, essa fase móvel – HNO_3 ($1,7 \text{ mmol L}^{-1}$) e DPA ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$) – foi avaliada para a eluição dos demais analitos. A vazão da fase móvel foi fixada em $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ para a realização desses experimentos. Após a análise de padrões monoelementares contendo Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Li^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} , foi possível verificar a eluição adicional somente de Mn^{2+} . Ou seja, quando padrões monoelementares contendo Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} foram analisados, nenhum pico foi observado em pelo menos 60 minutos de corrida. A análise de um padrão multielementar contendo os analitos que foram eluídos e o íon NH_4^+ foi realizada e o cromatograma é apresentado na Figura 5. Vale ressaltar que a separação do íon NH_4^+ dos analitos foi avaliada em todos os experimentos que visaram avaliar a composição

e a concentração da fase móvel, pois essa espécie poderia ser um potencial interferente durante a análise de amostras oriundas da MIC.

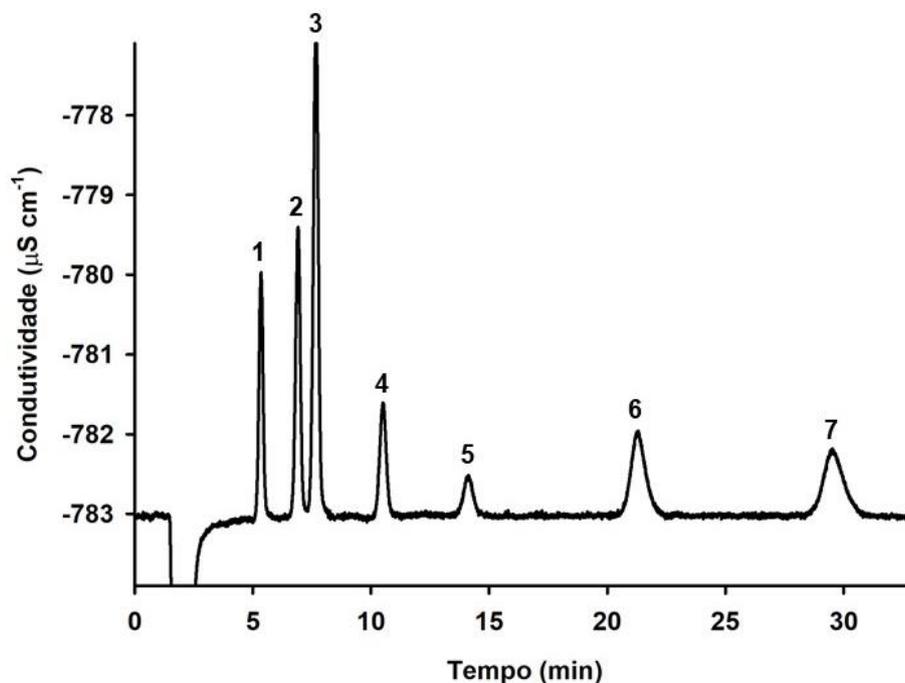


Figura 5. Cromatograma obtido para padrão multielementar contendo: 1) Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2) Na^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 3) NH_4^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 4) K^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 5) Mn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 6) Mg^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e 7) Ca^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) em água usando uma mistura de HNO_3 ($1,7 \text{ mmol L}^{-1}$) e DPA ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$) como fase móvel.

Embora essa fase móvel proporcione adequada separação de seis espécies metálicas (três metais alcalinos, dois metais alcalinos terrosos e um metal de transição), como demonstrado na Figura 5, faz-se necessário um tempo relativamente elevado de corrida ($\sim 30 \text{ min}$) e, ainda, não possibilita a detecção Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . Importante mencionar que o DPA é um ácido orgânico frequentemente utilizado na cromatografia de íons como um forte agente complexante e, de acordo com a literatura, favorece a eluição de alguns íons com cargas +2 e +3, através do mecanismo de complexação, formando espécies com cargas efetivas menores, como destacado no item 3.2.2.1 (Fundamentos e aplicações em IC) (BONN *et al.*, 1990; COWAN *et al.*, 2000; WEISS, 2016). É, provavelmente, devido a formação de complexos com carga neutra ou negativa com Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} – os quais não interagiriam com os grupos trocadores de íons e seriam eluídos no volume morto – que nenhum pico cromatográfico foi observado para essas espécies. Com base nisso,

soluções de ácido cítrico, ácido tartárico e ácido oxálico foram avaliadas como fase móvel. Essas soluções têm sido frequentemente utilizadas para a eluição de metais a partir de uma grande variedade de colunas cromatográficas (MICHALSKI, 2009; WEISS, 2016). Além disso, destacam-se por apresentar poder complexante intermediário – inferior ao DPA ou MSA – e, com isso, compatíveis com colunas de baixa capacidade, como a coluna utilizada neste trabalho.

A avaliação do ácido cítrico, ácido tartárico e ácido oxálico como fase móvel foi realizada através da análise de padrões monoelementares (5 mg L^{-1}) no sistema cromatográfico para a verificação do tempo de retenção de cada espécie, assim como foi realizado anteriormente. As concentrações avaliadas para cada ácido orgânico variaram de acordo com o comportamento de eluição e separação dos analitos. As concentrações máximas avaliadas foram limitadas pela condutividade, que não excedeu $1100 \mu\text{S cm}^{-1}$ durante todas as avaliações. De acordo com a literatura, essa é uma das principais limitações da detecção condutimétrica direta, uma vez que o aumento indiscriminado da concentração da fase móvel gera um sinal de fundo que contribui com a elevação da razão sinal/ruído e, conseqüentemente, com a redução na sensibilidade (WEISS, 2016). Dessa forma, concentrações que variaram de 4 a 12 mmol L^{-1} para o ácido cítrico, de 2 a 10 mmol L^{-1} para o ácido tartárico e de 0,5 a 3,0 mmol L^{-1} para o ácido oxálico, foram avaliadas nesse estudo. A seguir são apresentados os resultados obtidos após a avaliação desses ácidos orgânicos como fase móvel para a separação de íons de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição. Na Figura 6 é possível verificar a influência da concentração dos ácidos orgânicos na eluição/separação dos analitos.

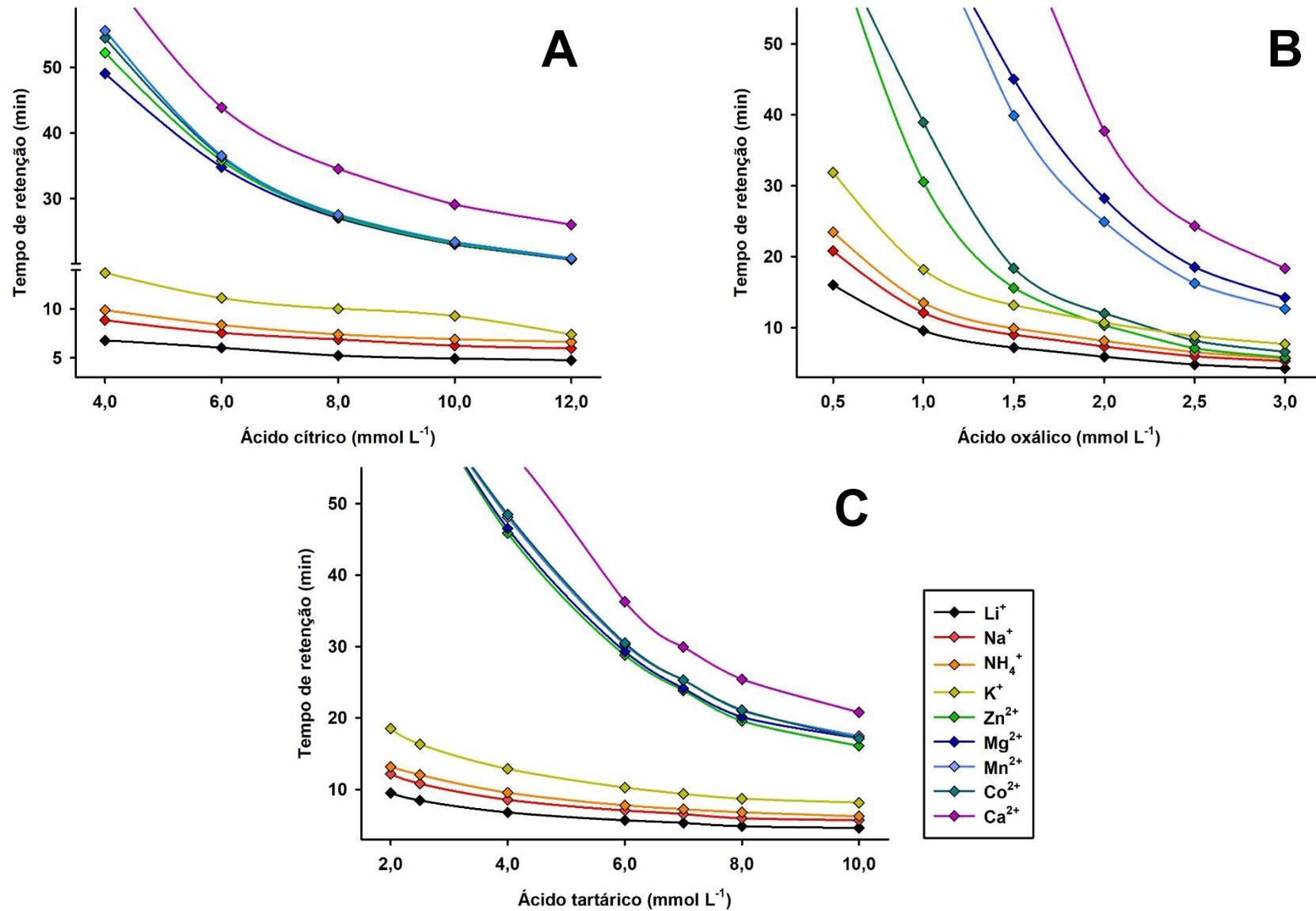


Figura 6. Tempos de retenção de cátions de metais alcalinos, alcalinos terrosos, de transição e do íon NH_4^+ a partir do uso de concentrações crescentes de: **A)** ácido cítrico ($4,0$ a $12,0 \text{ mmol L}^{-1}$); **B)** ácido tartárico ($2,0$ a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) ou **C)** ácido oxálico ($0,5$ a $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como fase móvel.

O uso dos ácidos orgânicos como fase móvel permitiu a eluição de metais alcalinos (K^+ , Li^+ e Na^+), alcalinos terrosos (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e de transição (Co^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}) em uma única corrida cromatográfica. Dos elementos avaliados, apenas as espécies Cu^{2+} e Fe^{2+} não foram identificadas durante a avaliação desses ácidos como fase móvel. Como pode ser observado na Figura 6, comportamentos similares foram observados na eluição dos analitos quando ácido cítrico (4,0 a 12,0 mmol L⁻¹) e ácido tartárico (2,0 a 10,0 mmol L⁻¹) foram utilizados como fase móvel. Embora os dois reagentes tenham permitido a adequada separação de Ca^{2+} , K^+ , Li^+ , Na^+ e NH_4^+ em toda a faixa de concentração avaliada, não possibilitaram a separação de Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} . O aumento da concentração das fases móveis constituídas de ácido cítrico ou ácido tartárico ocasionou a redução no tempo de retenção de todos os analitos, sendo mais acentuada para as espécies com carga +2.

É importante ressaltar que quando agentes complexantes são utilizados como fase móvel, o processo cinético da reação de troca iônica que ocorre na coluna se torna mais complexo. A retenção dos analitos é afetada, principalmente, pelo tipo e concentração do ligante da fase estacionária, pelo tipo e concentração da fase móvel e, ainda, pelo pH da fase móvel. As espécies retidas mais fortemente na coluna cromatográfica apresentam um grau de interação/complexação mais elevado com os ligantes da fase estacionária e, conseqüentemente, uma cinética de reação mais lenta. Por outro lado, quanto maior o grau de complexação entre o íon metálico e o ligante da fase móvel, menor será a retenção das espécies na fase estacionária. Apesar disso, alguns metais são eluídos mais rapidamente devido a predominância do mecanismo de separação regido por interações eletrostáticas.

Quando ácido cítrico e ácido tartárico são utilizados como fase móvel, os dois mecanismos ocorrem concomitantemente. Para os metais de carga +1, ocorre a predominância do mecanismo regido por interações eletrostáticas, enquanto que para os metais com carga +2 o mecanismo de complexação é o que predomina (JONES; NESTERENKO, 2008). Isso pode ser verificado através do comportamento de eluição das espécies metálicas. Os íons de carga +1 sofrem pequena influência no tempo de retenção devido ao aumento da concentração desses ácidos orgânicos. Por outro lado, os tempos de retenção dos íons de carga +2 são consideravelmente afetados. Outro fato que pode ser esclarecido está relacionado a sobreposição dos picos cromatográficos de algumas espécies metálicas. Segundo Jones e Nesterenko (2008), quando agentes complexantes são utilizados como fase móvel, a

sobreposição de picos cromatográficos de espécies metálicas ocorre em virtude das constantes de estabilidade dos complexos metálicos formados serem muito semelhantes.

Por sua vez, um comportamento de eluição diferente foi observado quando ácido oxálico foi utilizado como fase móvel, como pode ser observado na Figura 6. Embora os cátions eluídos da coluna cromatográfica usando ácido oxálico tenham sido os mesmos de quando ácido cítrico ou ácido tartárico foram utilizados como fase móvel, é possível verificar que, dependendo da concentração, o uso de ácido oxálico proporciona a adequada separação de todas as espécies metálicas e do íon NH_4^+ .

Importante ressaltar que as espécies Cu^{2+} e Fe^{2+} não foram identificadas em nenhum dos experimentos que visaram a otimização do tipo e composição da fase móvel. Como mencionado anteriormente, isso pode ter ocorrido devido a formação de complexos com carga neutra ou negativa, que eluiriam no volume morto, ou até mesmo em virtude dessas espécies não terem gerado sinal analítico na concentração utilizada (5 mg L^{-1}) em uma corrida de 60 minutos. Apesar disso, os resultados obtidos quando ácido oxálico foi utilizado como fase móvel para a eluição de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição em um sistema cromatográfico compacto equipado com uma coluna de baixa capacidade e com detecção condutimétrica direta, são considerados adequados para a proposta deste trabalho.

Tendo em vista que o uso de ácido oxálico em concentrações acima de $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ocasionou a sobreposição dos picos cromatográficos dos íons NH_4^+ e Zn^{2+} , a concentração de $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ foi selecionada para as demais avaliações. Na Figura 7 é possível observar o cromatograma obtido a partir da análise de um padrão multielementar, quando uma solução de ácido oxálico $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ foi utilizada como fase móvel.

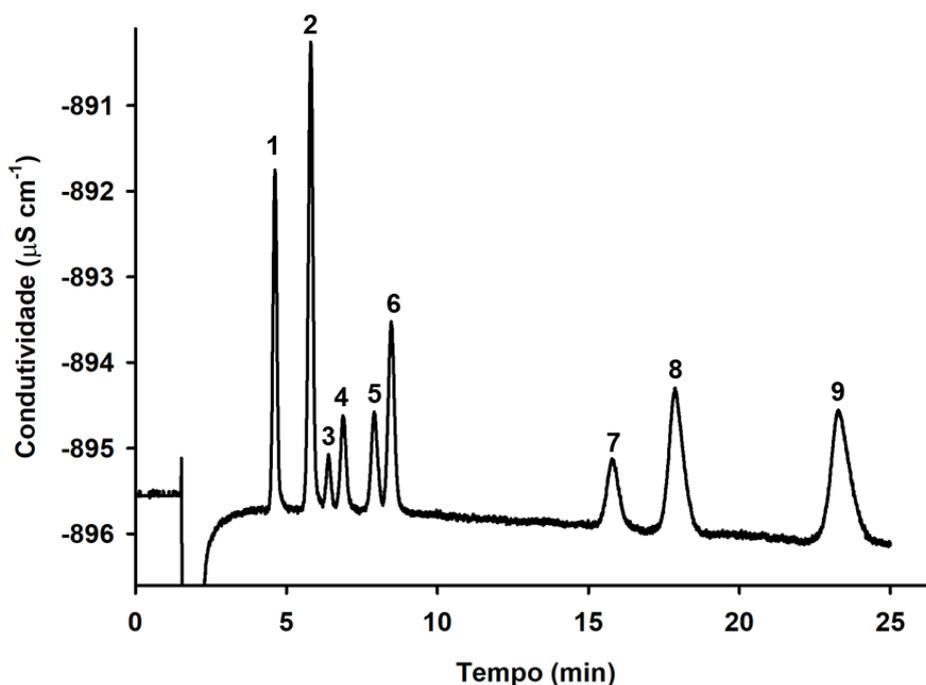


Figura 7. Cromatograma obtido para padrão multielementar contendo: 1) Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2) Na^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 3) NH_4^+ ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$); 4) Zn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 5) Co^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 6) K^+ ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 7) Mn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 8) Mg^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e 9) Ca^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) em água, usando ácido oxálico $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ como fase móvel.

Após a seleção de ácido oxálico $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ como o ácido orgânico mais adequado para a eluição dos analitos, a adição de HNO_3 foi avaliada com o intuito de reduzir o tempo de análise, com o cuidado de não ocasionar a sobreposição dos picos cromatográficos. Concentrações de $0,1$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HNO_3 seriam avaliadas – levando em consideração outros trabalhos na literatura (MICHALSKI, 2009; CALAND *et al.*, 2012) – no entanto o uso de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HNO_3 foi suficiente para ocasionar a sobreposição dos picos cromatográficos dos íons NH_4^+ e Zn^{2+} . É importante mencionar que, embora o uso de HNO_3 possibilite a redução do tempo de corrida em alguns casos, seu uso eleva consideravelmente a condutividade da linha base, mesmo em baixas concentrações, o que eleva a razão sinal-ruído e reduz a sensibilidade para os analitos – como mencionado no item 3.2.2.1 (Fundamentos e aplicações em IC). Portanto, o uso de HNO_3 em concentrações mais elevadas não foi avaliado.

A adição de um modificador químico na fase móvel também foi estudada. Essa avaliação foi realizada tendo em vista que a seletividade de trocadores catiônicos de ácidos fracos é afetada pelo uso solventes apróticos – como a acetonitrila. Isso ocorre,

pois, esse solvente minimiza de maneira considerável a dissociação dos grupos carboxílicos e esse fato, por sua vez, resulta na redução da capacidade de troca iônica. Além desse fenômeno, é importante mencionar que o aumento da pressão do sistema ocasionado devido ao aumento da concentração de acetonitrila na fase móvel também é determinante para a melhora na resolução dos picos e redução do tempo de análise. Os íons divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , são os mais influenciados, sendo possível reduzir o tempo de retenção dessas espécies em até 50% através do uso de acetonitrila 10% (v/v) em alguns casos (WEISS, 2016). Dessa forma, tendo em vista que essas espécies são as que apresentam os maiores tempos de retenção (aproximadamente 18 e 24 min para Mg^{2+} e Ca^{2+} , respectivamente) a partir do uso ácido oxálico $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$, o uso de acetonitrila 5,0%; 10%; 15%; 20% ou 30% (v/v) foi avaliado. Os resultados dessa avaliação são apresentados na Figura 8.

Assim como esperado, os íons divalentes são consideravelmente influenciados devido a presença de acetonitrila na fase móvel, enquanto que os íons monovalentes sofrem pequena influência. Com o uso de acetonitrila 30% (v/v) na fase móvel, o tempo de corrida foi reduzido em mais de 50%. Em consequência disso, a sensibilidade para algumas espécies, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , foi consideravelmente melhorada devido ao incremento da razão sinal-ruído. Apesar disso, essa condição ocasionou a eluição de Zn^{2+} no volume morto e a sobreposição dos picos cromatográficos de Co^{2+} e Na^+ . Dentre as condições avaliadas, somente quando acetonitrila 15% (v/v) foi utilizada como modificador químico na fase móvel que a separação de todas as espécies foi considerada adequada, levando em consideração a resolução cromatográfica dos picos ($R \geq 1,5$).

Por fim, a vazão da fase móvel (0,7; 0,8; 0,9 ou $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) foi avaliada. O aumento da vazão do eluente promoveu o deslocamento dos picos cromatográficos no sentido de redução dos tempos de retenção. No entanto, a sobreposição dos picos cromatográficos dos íons NH_4^+ e Zn^{2+} foi observada a partir do uso de uma vazão de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. Tendo em vista que a vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ não proporcionou uma melhora significativa na separação cromatográfica e, ainda, ocasionou o aumento da pressão do sistema, a vazão da fase móvel foi fixada em $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

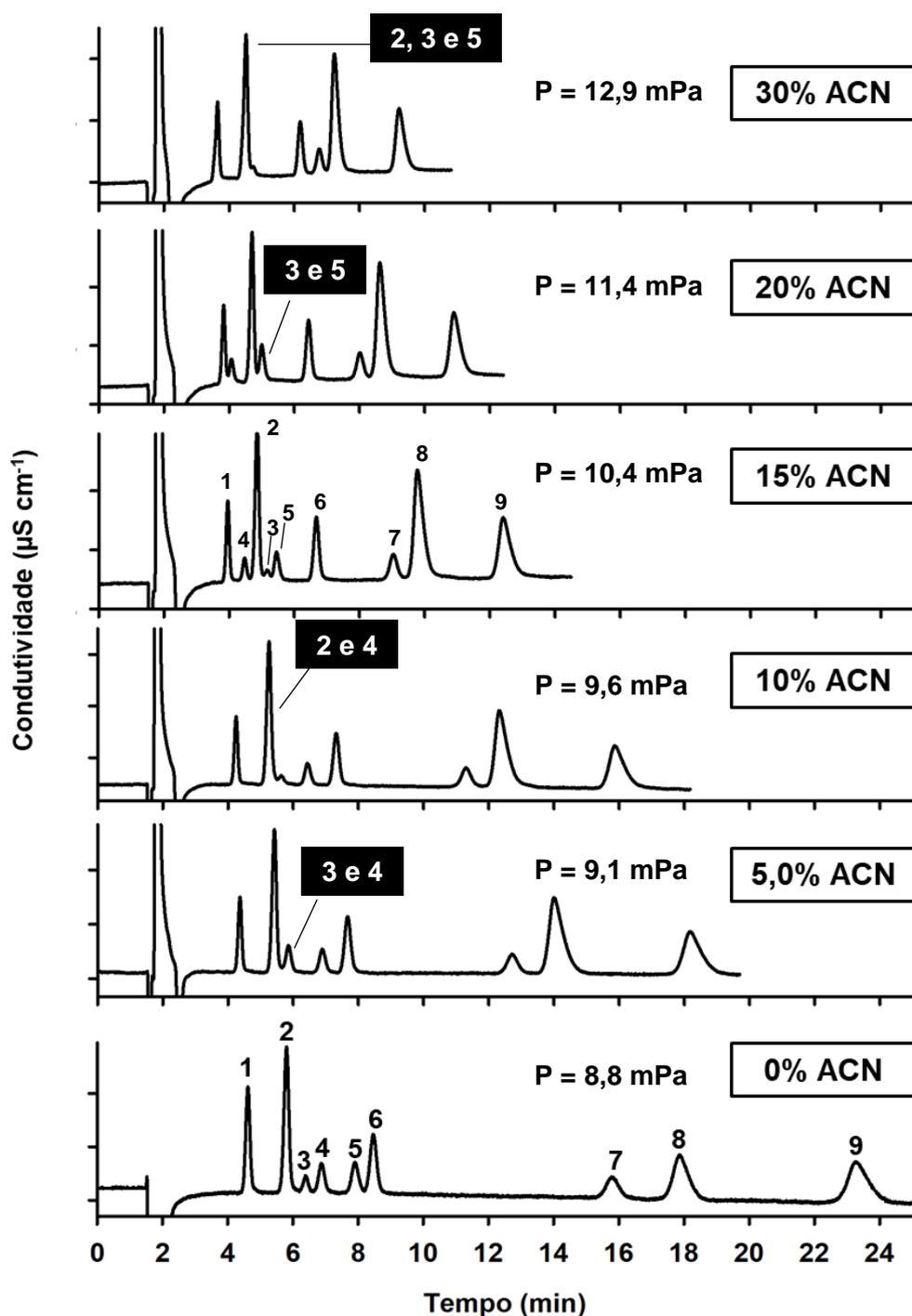


Figura 8. Influência do uso de acetonitrila como modificador químico na fase móvel (ácido oxálico $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Cromatogramas obtidos para padrão multielementar contendo: 1) Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2) Na^+ ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$); 3) NH_4^+ ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$); 4) Zn^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 5) Co^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 6) K^+ ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$); 7) Mn^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$); 8) Mg^{2+} ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e 9) Ca^{2+} ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) em água.

Vale ressaltar que a avaliação do pH das fases móveis estudadas não foi realizada. Esse parâmetro é de suma importância nos processos de complexação,

pois está diretamente associado ao poder complexante, principalmente, no caso dos ácidos orgânicos utilizados nesse estudo. Apesar disso, a alteração desse parâmetro quando espécies de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição são monitorados é extremamente complexa e pode impossibilitar a determinação de algumas espécies. Isso ocorre pois é necessária a adição de outro reagente na fase móvel para promover a mudança de pH. No caso dos ácidos orgânicos utilizados neste estudo, por exemplo, o pH ácido poderia ser elevado através do uso de uma base forte (LiOH, NaOH e KOH são as mais utilizadas), contudo, isso inviabilizaria a determinação dessas espécies. Além disso, como foi possível verificar, a avaliação desse parâmetro não foi necessária, uma vez que as espécies não identificadas em todos os experimentos (Cu^{2+} e Fe^{2+}) foram, provavelmente, eluídas no volume morto. Ou seja, ainda que essa avaliação fosse realizada com o intuito de eluir/separar essas espécies, o aumento do pH dessas soluções não seria a melhor estratégia.

O aumento do pH das fases móveis avaliadas resultaria na alteração do equilíbrio químico dos ligantes disponíveis em solução para complexação. O ácido oxálico, por exemplo, apresenta dois hidrogênios ionizáveis em sua estrutura. Em $\text{pH} \leq 1$, os grupos carboxila dessa molécula em solução se encontram, em sua maioria, não dissociados ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$). Por outro lado, em uma faixa de pH mais elevada (entre 2 e 4), provavelmente, o poder complexante aumentaria e contribuiria para uma redução nos tempos de retenção de alguns metais, uma vez que a forma predominante em solução (HC_2O_4^-) apresentaria um sítio livre para interação com espécies catiônicas, favorecendo a formação de complexos. Isso ocorreria, pois, a ligação COO-H é muito fraca e um pequeno incremento nos valores de pH favoreceria o rompimento dessa ligação. Por sua vez, em $\text{pH} \geq 6$ esse ácido está quase em sua totalidade dissociado ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$)¹. Esse comportamento é muito semelhante entre os ácidos orgânicos avaliados como fase móvel e, como as concentrações avaliadas foram relativamente baixas, o pH dessas soluções – ácido cítrico (2,5 a 3,0); ácido tartárico (2,4 a 3,0) e ácido oxálico (2,8 a 3,4) – não foi suficientemente ácido para evitar a dissociação e, em consequência disso, anular o poder complexante desses ácidos.

Para verificar a qualidade de separação das condições cromatográficas selecionadas (ácido oxálico $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila 30% (v/v) com vazão de 0,7

¹ Informações obtidas a partir de um diagrama de equilíbrio químico para uma solução de ácido oxálico 2 mmol L^{-1} elaborado pelo autor a partir do *software Medusa (Chemical Equilibrium Diagrams)*. Software disponível em: <<https://www.kth.se/che/medusa/chemeq-1.369367>>.

mL min⁻¹) para a determinação Ca²⁺, Co²⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺ e Zn²⁺ em um sistema cromatográfico compacto, equipado com uma bomba isocrática e detecção condutimétrica direta, alguns parâmetros cromatográficos como o fator de capacidade (k), a seletividade (α), a resolução (R), o fator de assimetria (A_s) e o RSD (%) da área dos picos foram determinados e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos obtidos a partir da análise de um padrão multielementar contendo: Li⁺ (0,5 mg L⁻¹); Zn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); Na⁺ (1,0 mg L⁻¹); Co²⁺ (1,5 mg L⁻¹); K⁺ (1,0 mg L⁻¹); Mn²⁺ (1,5 mg L⁻¹); Mg²⁺ (1,0 mg L⁻¹) e Ca²⁺ (1,0 mg L⁻¹) em água (n=9).

Parâmetros cromatográficos*						
Analitos	Tempo de retenção (min)	Fator de capacidade (k)	Seletividade (α)	Resolução (R)	Fator de assimetria (A_s)	RSD (%)
Li ⁺	3,9	1,3	1,3	2,8	1,1	0,4
Zn ²⁺	4,5	1,6	1,1	1,7	1,0	1,4
Na ⁺	4,9	1,9	1,2	2,4	0,9	0,6
Co ²⁺	5,5	2,2	1,3	4,2	1,2	1,2
K ⁺	6,7	2,9	1,5	6,5	1,0	0,8
Mn ²⁺	9,1	4,3	1,1	1,5	1,0	1,3
Mg ²⁺	9,8	4,8	1,3	4,3	1,2	0,9
Ca ²⁺	12,4	6,3	1,3	4,3	1,2	1,0

*Critérios de aceitação recomendados: $k \geq 2$; $\alpha > 1$; $R \geq 1,5$; $A_s = 0,9$ a $1,2$ e $RSD \leq 2\%$ (BLIESNER, 2006).

De acordo com os parâmetros cromatográficos apresentados na Tabela 4, é possível constatar que o método cromatográfico desenvolvido é adequado para a determinação dos analitos. Embora o fator de capacidade para Li⁺, Zn²⁺ e Na⁺ tenha sido inferior ao valor recomendado pela literatura, o método cromatográfico se mostrou adequado para a determinação dessas espécies, como pode ser observado na Figura 9. Esses valores estão associados a proximidade dos picos cromatográficos dessas espécies com o pico do sistema.

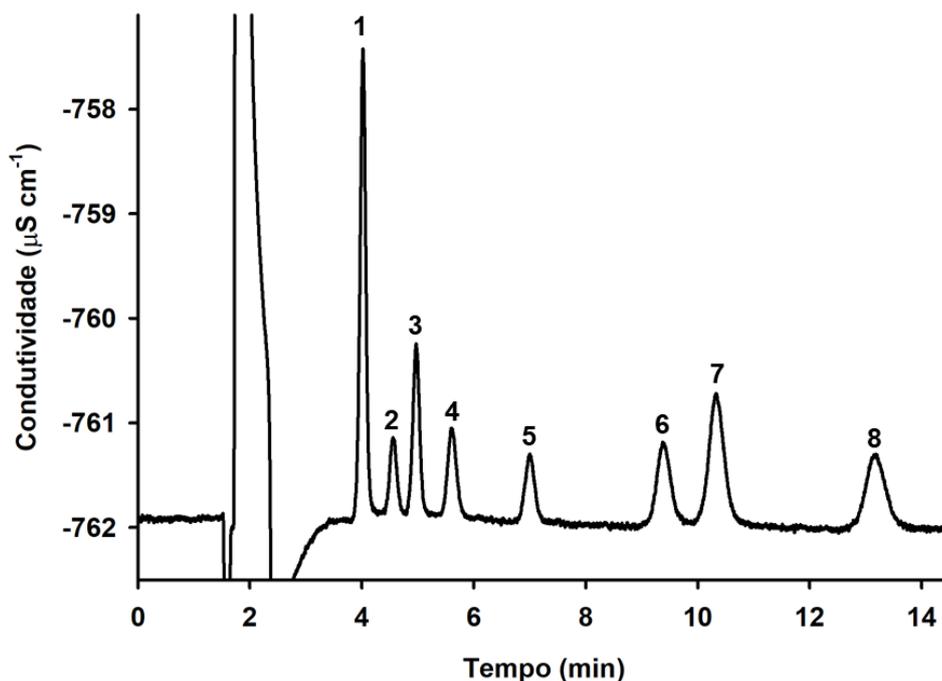


Figura 9. Cromatograma obtido para padrão multielementar contendo: 1) Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2) Zn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 3) Na^+ ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$); 4) Co^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 5) K^+ ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$); 6) Mn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 7) Mg^{2+} ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e 8) Ca^{2+} ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em água, usando as condições cromatográficas selecionadas.

5.2.2 Influência da acidez na determinação de metais por IC-DC

Após a seleção das melhores condições cromatográficas para a determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição por IC-DC, a influência da acidez das soluções de análise foi avaliada. A acidez é um dos principais problemas para a determinação de metais por IC-DC e, de acordo com a literatura, é o que faz com que a IC-DC seja tão pouco explorada para a determinação dessas espécies em matrizes sólidas (MORALES-RUBIO; DE LA GUARDIA, 2015; WEISS, 2016). A análise por IC requer a conversão de matrizes sólidas em uma solução e, dependendo da complexidade da matriz, pode ser uma tarefa consideravelmente difícil. O uso de ácidos concentrados é a estratégia mais adotada devido a elevada eficiência de digestão que pode proporcionar. No entanto, a acidez residual nessas soluções é geralmente bastante elevada, o que pode inviabilizar a análise por técnicas mais suscetíveis, como a IC-DC. Além disso, o uso de ácidos concentrados proporciona

uma série de desvantagens, como comentando anteriormente. No entanto, até mesmo o uso de ácidos diluídos na etapa de preparo de amostras pode resultar em uma acidez residual incompatível com a determinação por IC. Por essa razão, como descrito no item 4.7.2 (Influência da acidez na determinação de metais por IC-DC), a influência da concentração ácida foi avaliada na determinação de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} por IC-DC e os resultados são apresentados na Figura 10.

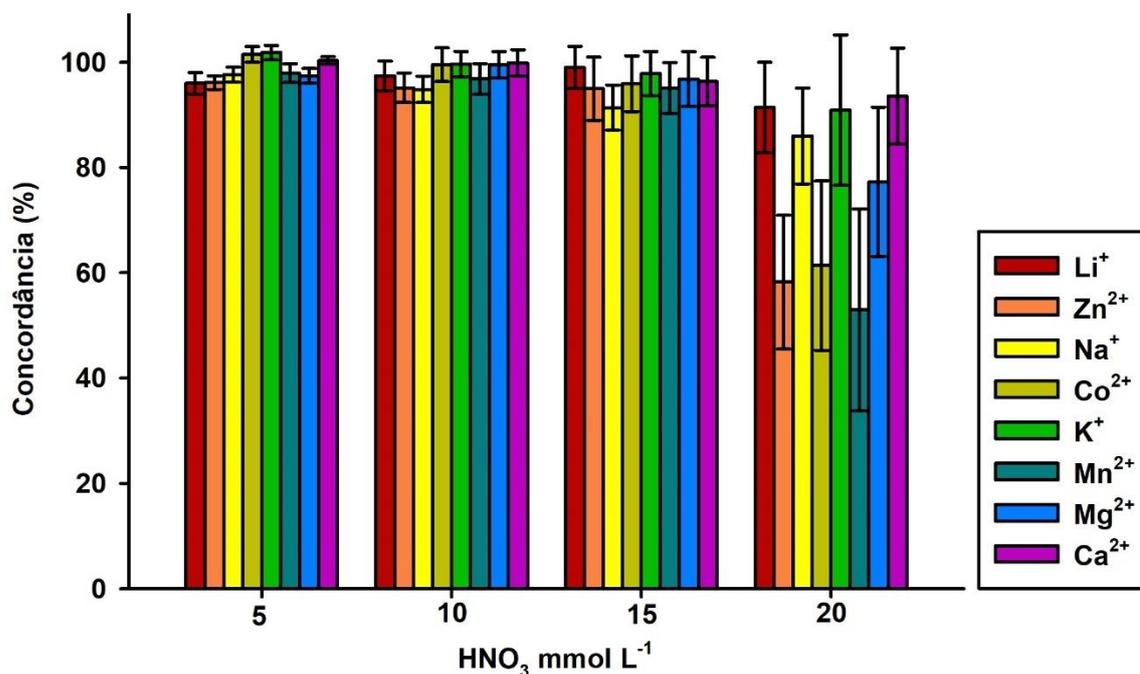


Figura 10. Influência da acidez na determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição por IC-DC (n=3).

Para a realização desse estudo, soluções padrão multielementares preparadas em meio de HNO_3 (5, 10, 15 ou 20 mmol L^{-1}) foram analisadas a partir do método cromatográfico desenvolvido. De acordo com a Figura 10 pode-se constatar que a determinação de metais por IC-DC é notavelmente afetada pelo incremento da concentração ácida no meio. No entanto, os resultados obtidos até a concentração de 15 mmol L^{-1} de HNO_3 não apresentaram diferenças significativas daqueles observados a partir da análise de padrões multielementares preparados em água (teste *t*-student, nível de confiança de 95%), embora os RSDs tenham sido mais elevados (até 6%) nessa condição. Por sua vez, quando a concentração de 20 mmol L^{-1} foi avaliada, somente as concentrações de K^+ , Li^+ e Ca^{2+} apresentaram valores médios (com RSDs que variaram de 10 a 16%) que não diferiram estatisticamente

daqueles obtidos em meio aquoso. Além disso, o efeito do aumento da concentração ácida é perceptível nos cromatogramas devido a oscilação da linha base e deformação dos picos cromatográficos.

A partir desse estudo, comprova-se a importância do desenvolvimento de métodos de preparo de amostras que possibilitem o uso de ácido diluídos, como a MIC, para que seja possível a determinação de metais por IC-DC. De acordo com Crizel (2015), por exemplo, que realizou a determinação da acidez residual de uma amostra de suplemento hipercalórico submetida a digestão assistida por micro-ondas com HNO_3 concentrado, a acidez residual da solução resultante é de aproximadamente 35%, ou seja, uma concentração molar próxima de 5 mol L^{-1} . Nesse caso, seria necessário um fator de diluição da ordem de 350 vezes para proporcionar a determinação de metais por IC-DC com adequada precisão e exatidão. Isso ocasionaria a elevação dos LODs e LOQs e, provavelmente, inviabilizaria a determinação dos analitos.

Nos itens subsequentes serão apresentados os resultados relativos à otimização da MIC para o preparo de amostras de suplementos hipercalóricos, multivitamínicos e/ou minerais e botânicos visando à determinação de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} a partir do método cromatográfico otimizado.

5.3 AVALIAÇÃO DA MIC PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

Alguns parâmetros como a massa, a pressão de O_2 , a solução absorvedora e o programa de irradiação com micro-ondas foram avaliados no preparo de amostras de suplementos dietéticos por MIC com o intuito de garantir a obtenção de resultados exatos e precisos. Embora a MIC seja um método considerado robusto e capaz de preparar amostras com uma grande variedade de composição (CHRISTOPHER; VETTER, 2016), os suplementos dietéticos avaliados neste trabalho apresentam matrizes substancialmente diferentes – como verificado no item 5.1 (Determinação do teor de cinzas sulfatadas – e tornam a avaliação desses parâmetros imprescindíveis.

A seguir serão apresentados os resultados da otimização da MIC para o preparo de amostras de suplemento hipercalórico, suplemento multivitamínico e/ou

mineral e suplemento botânico visando à subsequente determinação de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} por IC-DC.

5.3.1 Suplemento hipercalórico

A primeira matriz avaliada para o preparo de amostras por MIC foi a de suplemento hipercalórico. De acordo com o rótulo do suplemento dietético selecionado para a realização desses experimentos (SHP-1), a matriz é rica em carboidratos (~80%) e proteínas (~15%). Matrizes com essas características são, geralmente, digeridas por MIC com sucesso (BARIN *et al.*, 2014; KRUG; ROCHA, 2016). No entanto, existe uma limitação com relação a massa de amostra a ser decomposta. Por essa razão, inicialmente, um ensaio visando avaliar a máxima massa de amostra a ser decomposta por MIC, através da observação do aspecto da solução, foi realizado. O aumento da massa de amostra durante a etapa de preparo de amostra é de extrema importância no presente estudo, uma vez que uma técnica com sensibilidade limitada será utilizada para a determinação dos analitos. Na Figura 11 é possível observar o aspecto das soluções resultantes da decomposição de massas de amostra que variaram de 400 a 900 mg. Importante mencionar que, para a realização desse experimento, os demais parâmetros como a solução absorvedora, a pressão de O_2 e o tempo de refluxo no programa de irradiação com micro-ondas foram fixados em HNO_3 1 mol L^{-1} , 20 bar e 5 min a 1400 W, respectivamente. Os parâmetros fixados foram baseados em trabalhos prévios (FLORES *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2011; BARIN *et al.*, 2012). Além disso, todas as avaliações foram realizadas levando em consideração somente as concentrações dos analitos quantificados por IC-DC. Os analitos não quantificados nos ensaios de otimização, foram avaliados, posteriormente, durante a avaliação da exatidão do método proposto.

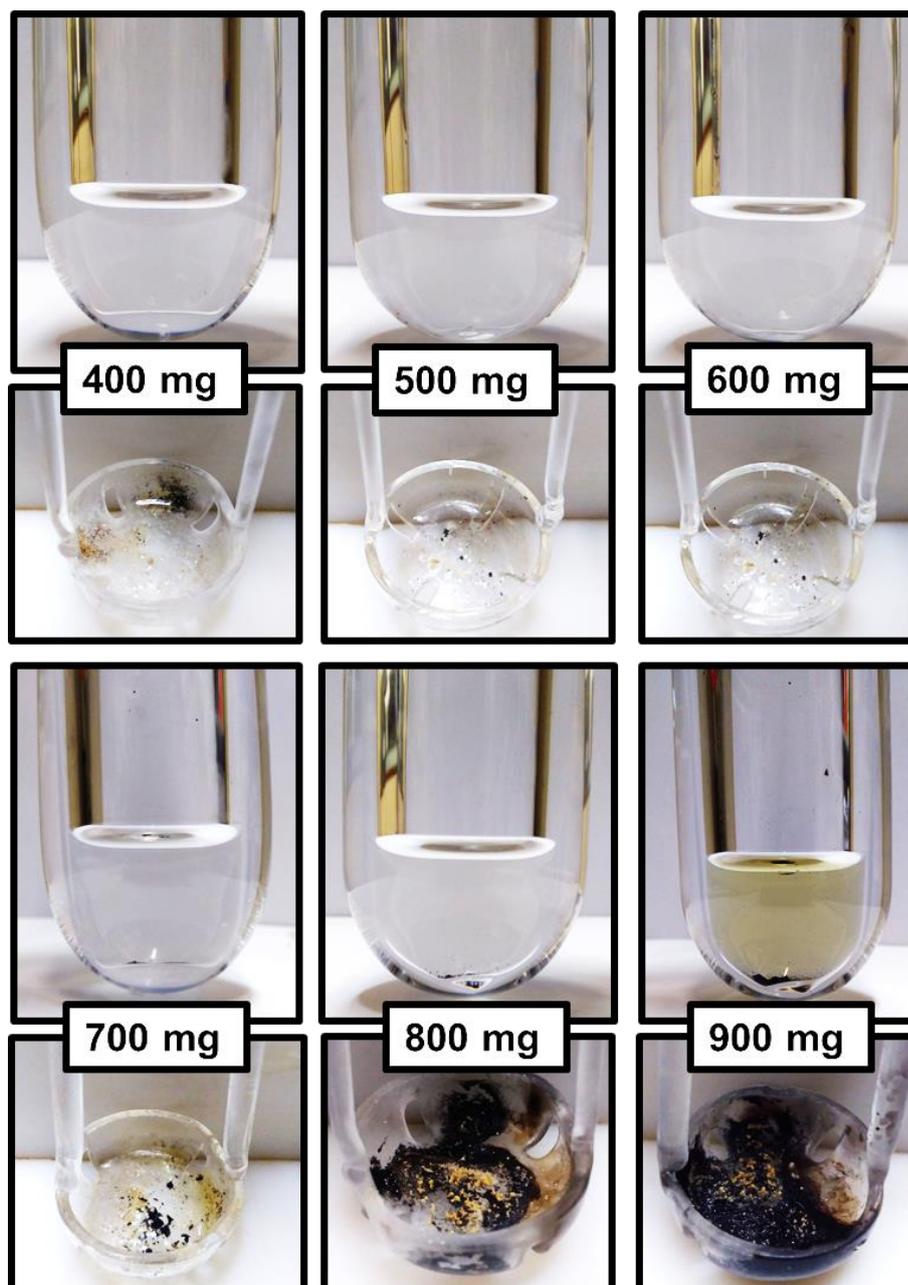


Figura 11. Aspecto das soluções obtidas e dos suportes após a digestão de massas crescentes de suplemento hipercalórico (400 a 900 mg) por MIC usando 25 bar de pressão de O_2 , HNO_3 1 mol L^{-1} como solução absorvedora e 5 min de refluxo a 1400W.

As soluções resultantes da combustão de massas de amostras de 400 a 800 mg apresentaram aspecto límpido, enquanto que a solução resultante da combustão de 900 mg apresentou coloração amarelada, característico de uma combustão incompleta. Por sua vez, uma quantidade muito pequena de resíduo foi observada nos suportes em que massas de 400 a 600 mg foram decompostas. A combustão de

700 mg gerou uma quantidade de resíduo um pouco superior. No entanto, os suportes que continham 800 e 900 mg de amostra apresentaram resíduos com aspectos diferentes dos observados na decomposição de massas inferiores. Além disso, fica evidente a presença de amostra carbonizada na base do suporte quando 800 e 900 mg foram submetidas a MIC. Com base nessa avaliação inicial, as soluções que apresentaram aspecto límpido foram analisadas por IC-DC, independente da presença de resíduos – como observado na combustão de 700 e 800 mg – para verificar o comportamento da concentração das espécies quantificadas nessas soluções.

Cabe enfatizar que apenas K^+ e Na^+ foram quantificados por IC-DC em todas as soluções analisadas, e não foram observadas diferenças significativas nas concentrações desses elementos quando massas de 400, 500, 600, 700 e 800 mg foram decompostas por MIC (ANOVA/teste de Tukey, nível de confiança de 95%). Por sua vez, Ca^{2+} e Mg^{2+} foram quantificados somente quando massas de amostra iguais ou superiores a 600 mg foram utilizadas. As concentrações desses elementos não diferiram estatisticamente quando massas de 600 e 700 mg foram utilizadas. No entanto, um decréscimo significativo nas concentrações de ambas as espécies foi observado quando a solução resultante da combustão de 800 mg foi analisada. Isso está provavelmente relacionado à combustão incompleta dessa massa de amostra que, embora tenha apresentado uma solução com aspecto límpido, resultou na presença de uma maior quantidade de resíduo na base do suporte e, ainda, com aspecto diferente do que foi observado para a combustão de massas inferiores (Figura 11). Outra provável explicação está relacionada a menor capacidade da solução absorvedora em recuperar quantitativamente os analitos quando uma quantidade maior de resíduo permanece no suporte. Assim, a massa de 700 mg foi selecionada para a otimização dos demais parâmetros.

Importante mencionar que a combustão de 700 mg de suplemento hipercalórico resultou em RSDs mais elevados para Ca^{2+} e Mg^{2+} (~10%) quando comparados aos que foram determinados nas soluções resultantes da combustão de 600 mg de amostra (~6%). Isso está possivelmente relacionado a presença de pequenas quantidades de fuligem no frasco quando 700 mg de suplemento hipercalórico foram submetidos a decomposição por MIC. Com o intuito de eliminar a fuligem nessa condição e, em consequência disso, reduzir os RSDs para os analitos, o aumento da pressão de O_2 foi avaliado (20, 25 ou 30 bar). No entanto, foi necessário

avaliar as pressões máximas atingidas durante o processo de combustão em função da variação da pressão inicial de oxigênio com o intuito de garantir a segurança operacional. Assim, foram decompostos 700 mg de suplemento dietético e a pressão máxima atingida em cada caso foi registrada, conforme mostrado na Figura 12.

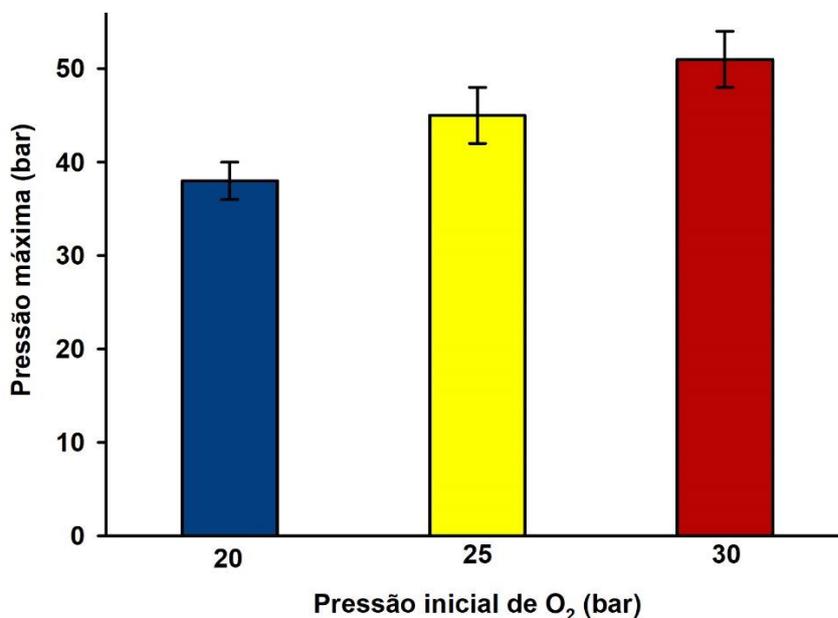


Figura 12. Pressão máxima atingida no sistema para diferentes pressões iniciais de oxigênio utilizadas na decomposição de 700 mg de suplemento hipercalórico (n=3).

Assim, como esperado, a pressão máxima atingida no sistema aumenta com o incremento da pressão inicial de oxigênio durante a combustão de 700 mg de suplemento hipercalórico. Apesar disso, mesmo com o uso de pressão inicial de 30 bar, a pressão máxima foi de aproximadamente 50 bar, valor equivalente a 63% do valor máximo de pressão estabelecido em termos de segurança operacional (80 bar). Portanto, nesse caso é considerado seguro o uso de até 30 bar de pressão inicial de O₂. No entanto, após a realização desses experimentos foi possível verificar que o uso de 25 bar de pressão inicial de O₂ já foi suficiente para eliminar a presença de fuligem no frasco de reação, bem como reduzir os RSDs para Ca²⁺ e Mg²⁺ (~7%). Em razão disso, a pressão de O₂ foi fixada em 25 bar para a realização dos demais experimentos.

Após a avaliação da massa de amostra e da pressão inicial de O₂, soluções de HNO₃ com concentrações que variaram de 0,1 a 4 mol L⁻¹ foram avaliadas inicialmente

como solução absorvedora na MIC. É bem estabelecido na literatura que a solução absorvedora utilizada para reter os analitos é um importante parâmetro nos sistemas de combustão, uma vez que pode afetar a recuperação quantitativa dos analitos. A escolha por soluções diluídas de HNO_3 durante essa avaliação ocorreu em virtude da existência de estudos em que recuperações adequadas para alguns metais e metalóides foram obtidas usando soluções de HNO_3 diluídas (de até 1 mol L^{-1}) como solução absorvedora na MIC (MELLO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011). Além disso, o uso de soluções diluídas para a absorção dos analitos resulta na obtenção de soluções mais compatíveis com a determinação por IC-DC. Assim, esse estudo foi realizado visando a escolha da menor concentração ácida possível devido a todas as vantagens que isso poderia resultar tanto na etapa de preparo quanto na determinação dos analitos. Os resultados dessa avaliação são apresentados na Figura 13.

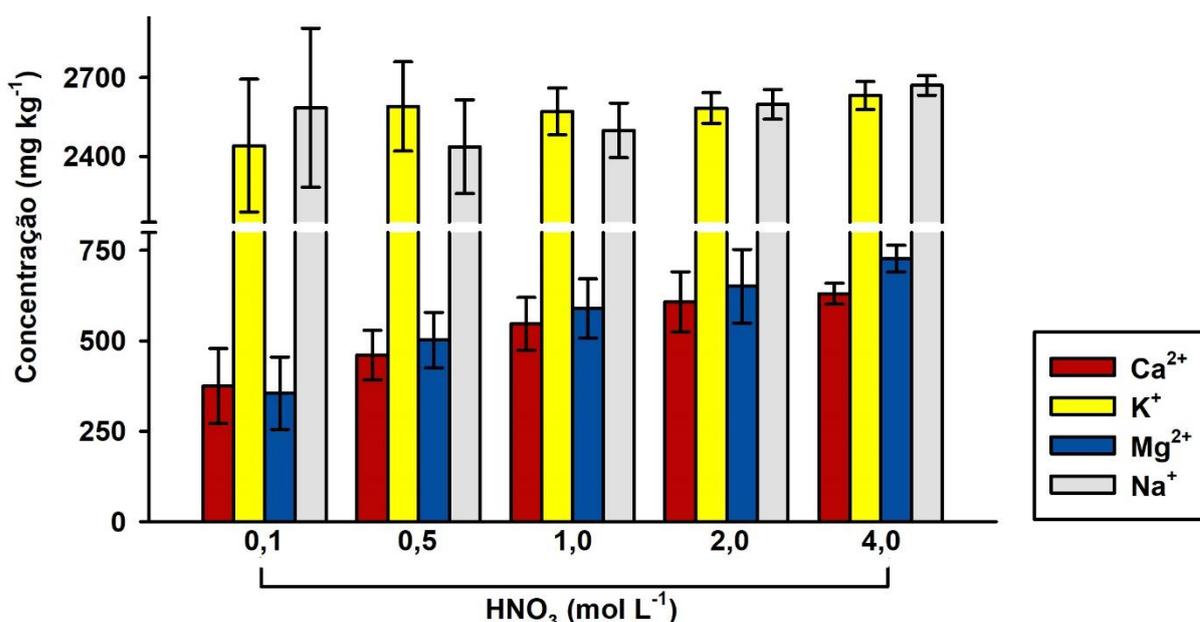


Figura 13. Influência da concentração de HNO_3 na absorção de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Na^+ após a decomposição de 700 mg de suplemento hipercalórico por MIC, usando 25 bar de pressão de O_2 e 5 min de tempo de refluxo a 1400W (n=3).

A partir dos resultados apresentados na Figura 13, é possível perceber que as concentrações de K^+ e Na^+ apresentaram um comportamento bastante semelhante. Embora as concentrações dessas espécies não tenham apresentado diferenças significativas durante essa avaliação (ANOVA/teste de Tukey, nível de confiança de

95%), os RSDs foram mais elevados ($\leq 12\%$) quando soluções mais diluídas de HNO_3 (inferior a 1 mol L^{-1}) foram utilizadas para a absorção dos analitos. Por sua vez, o perfil das concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} durante essa avaliação demonstram a existência de uma tendência. Com o aumento da concentração de HNO_3 , observa-se um aumento da concentração de ambos analitos até a concentração de 1 mol L^{-1} de HNO_3 . A partir dessa concentração não foram observadas diferenças significativas na concentração dessas espécies. No entanto, RSDs elevados ($> 13\%$) foram observados quando soluções de HNO_3 1 ou 2 mol L^{-1} foram utilizadas como solução absorvedora.

Os resultados obtidos durante a avaliação inicial da solução absorvedora podem ser um indicativo de que somente soluções de HNO_3 com concentrações iguais ou superiores a 4 mol L^{-1} seriam adequadas para garantir recuperações quantitativas desses analitos com adequada precisão. Apesar disso, é importante mencionar que para a análise por IC-DC das soluções resultantes da MIC quando HNO_3 4 mol L^{-1} foi utilizada como solução absorvedora, fez-se necessário a redução da acidez através da neutralização parcial da solução. Isso foi realizado com o intuito de reduzir os fatores de diluição requeridos para minimizar o efeito da acidez e, com isso, tornar possível a adequada quantificação dos analitos. A neutralização parcial dessas soluções foi realizada com uma solução de LiOH 500 mmol L^{-1} . Considerando que o uso de LiOH impossibilitaria a determinação de Li^+ e que acarretaria em outros inconvenientes ao método, como o possível aumento dos valores de brancos analíticos, esse procedimento só foi realizado nesse caso para obtenção das concentrações de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Na^+ para a comparação com as demais condições. Portanto, em vista desses resultados, verificou-se a necessidade de avaliar outras soluções para a absorção dos analitos.

É válido destacar que a necessidade do uso de soluções de HNO_3 mais concentradas para a adequada absorção de alguns metais foi observada em outros trabalhos e está, possivelmente, relacionada com a reduzida capacidade de soluções mais diluídas na solubilização dos prováveis óxidos metálicos formados durante a combustão (PEREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011). Uma interessante estratégia adotada por Pereira *et al.* (2010) a fim de contornar esse inconveniente foi a de avaliar o uso de soluções contendo HCl e HNO_3 . O HCl forma complexos estáveis com vários íons metálicos, sendo que a maioria dos cloretos metálicos são solúveis em água. Além disso, esse ácido é utilizado na dissolução da maioria dos metais mais

eletropositivos que o hidrogênio e tem a capacidade de dissolver muitos boratos, carbonatos, fosfatos e sulfetos (KRUG; ROCHA, 2016). O uso de HCl misturado a HNO₃ tem sido uma estratégia frequentemente utilizada, pois essa mistura é capaz de reagir com a maioria dos metais. Com base nisso, soluções contendo HNO₃ (1,0; 0,5; ou 1,0 mol L⁻¹) e HCl (1,0; 0,5; ou 1,0 mol L⁻¹) foram avaliadas como solução absorvedora. Os resultados dessa avaliação são apresentados na Figura 14.

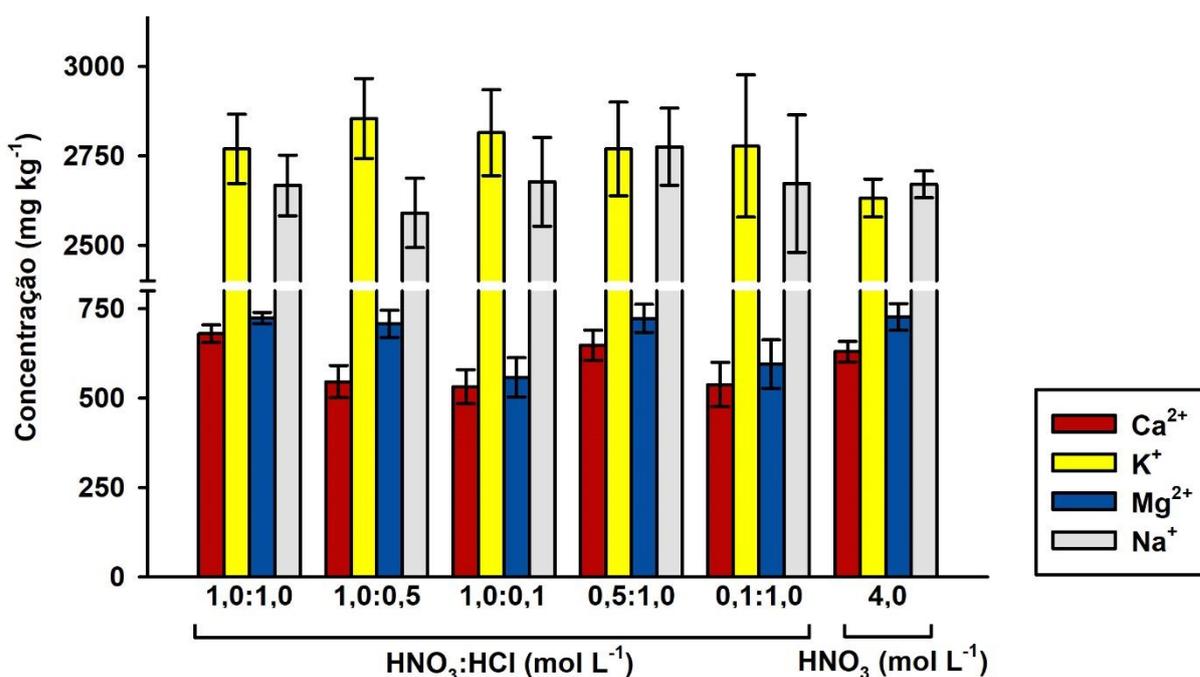


Figura 14. Influência da concentração de HNO₃ e HCl na absorção de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ e Na⁺ após a decomposição de 700 mg de suplemento hipercalórico por MIC, usando 25 bar de pressão de O₂ e 5 min de refluxo a 1400W (n=3).

Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que somente quando HCl 1 mol L⁻¹ combinado com HNO₃ 0,5 ou 1,0 mol L⁻¹ foram utilizados como solução absorvedora que as concentrações de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ e Na⁺ não diferiram significativamente daquelas obtidas usando HNO₃ 4 mol L⁻¹. Esses resultados estão, provavelmente, associados ao poder complexante do HCl e/ou a capacidade desse ácido – mesmo que diluído – em reter/estabilizar melhor essas espécies em solução. Assim, a solução contendo HCl 1 mol L⁻¹ combinado com HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ foi selecionada como a solução absorvedora mais adequada, pois além dos resultados não terem diferido dos obtidos quando HNO₃ 4 mol L⁻¹ foi utilizado, essa condição possibilitou menores RSDs (≤ 4%). É importante mencionar que em nenhuma das

condições avaliadas o uso de LiOH foi requerido para minimizar o efeito da acidez residual. No entanto, um fator de diluição de no mínimo 25 vezes foi requerido para que não houvesse interferências na determinação dos analitos por IC-DC quando, por exemplo, uma solução contendo HCl 1 mol L⁻¹ e HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ foi utilizada para a absorção dos analitos.

Por fim, a etapa de refluxo no programa de irradiação com micro-ondas também foi avaliada. De acordo com a literatura, é na etapa de refluxo que a recuperação quantitativa dos analitos é garantida, tendo em vista que é nessa etapa que as paredes do frasco e o suporte no qual a amostra é decomposta são lavados devido ao aquecimento da solução absorvedora. Para esse estudo, 700 mg de amostra foram decompostas usando 25 bar de pressão de O₂, 6 mL de uma solução para a absorção dos analitos contendo HNO₃ 1 mol L⁻¹ e HCl 1 mol L⁻¹, a partir do uso de tempos refluxo de 0, 5, 10, 15 ou 30 min. Assim, como esperado, a partir do uso de 5 min de refluxo a 1400 W, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações dos analitos e, portanto, esse tempo foi selecionado para a realização dos ensaios visando avaliar a exatidão do método.

5.3.2 Suplemento multivitamínico/mineral

Após a otimização da MIC para o preparo de amostras de suplemento hipercalórico, a decomposição de suplementos multivitamínicos/minerais também foi avaliada. No entanto, apenas a massa de amostra e o tempo de refluxo foram avaliados para essa matriz. A pressão inicial de O₂ e a solução absorvedora selecionadas para essa otimização foram as mesmas que proporcionaram a obtenção dos melhores resultados na avaliação da MIC para a decomposição de suplementos hipercalóricos. Dessa forma, massas de amostra (SMVM-1) que variaram de 400 a 1100 mg foram decompostas por MIC utilizando 25 de bar de pressão inicial de O₂, 6 mL de uma solução contendo HNO₃ 1 mol L⁻¹ e HCl 1 mol L⁻¹, e com 5 min de refluxo a 1400 W. Assim como realizado para o suplemento hipercalórico, a avaliação preliminar da máxima massa de amostra a ser decomposta por MIC foi feita com base no aspecto das soluções resultantes, como pode ser observado na Figura 15. Cabe mencionar que o aspecto das soluções resultantes da decomposição de massas de

amostra de 400 ou 500 mg não foram apresentadas na Figura 15, na próxima página, mas demonstraram o mesmo comportamento das demais condições avaliadas.

As soluções resultantes da combustão de todas as massas de amostras avaliadas apresentaram aspecto límpido. Por sua vez, uma quantidade considerável de resíduo foi observada na base do suporte de quartzo após a decomposição. É importante ressaltar que a quantidade de resíduo foi proporcional a massa de amostra utilizada, ou seja, quanto maior a massa de amostra submetida a decomposição, maior a quantidade de resíduo. Esse resultado vai ao encontro da informação obtida na determinação do teor de cinzas dessa amostra, que foi de aproximadamente 50%. Isso significa que somente a porção orgânica da matriz é decomposta por MIC e explica o porquê que as soluções resultantes da combustão de massas consideravelmente elevadas de amostra (1100 mg) apresentaram aspecto límpido. De fato, a massa de amostra efetivamente decomposta quando 1100 mg são utilizados é de, aproximadamente, 550 mg (50% da massa inicialmente submetida a decomposição). Foi, provavelmente, devido a este fato que a pressão máxima atingida no sistema durante a combustão de uma massa de 1100 mg – usando 25 bar de pressão inicial de O₂ – foi de apenas 32 ± 2 bar (n=3).

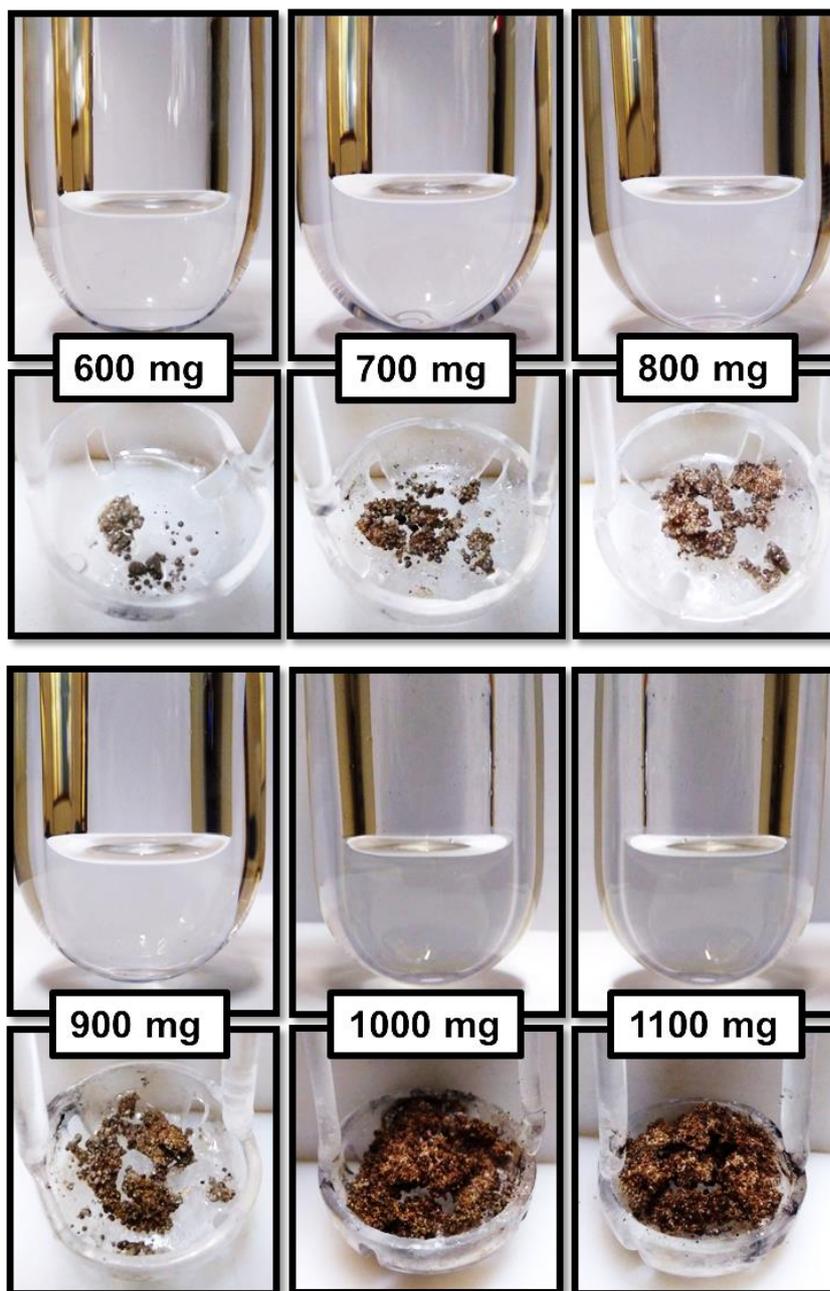


Figura 15. Aspecto das soluções obtidas e dos suportes após a digestão de massas crescentes de suplemento multivitamínico/mineral (600 a 1100 mg) por MIC usando 25 bar de pressão de O_2 , $HNO_3:HCl$ (1,0:1,0 mol L^{-1}) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W.

Tendo em vista que provavelmente a maior parte dos analitos estão contidos no resíduo inorgânico que fica no suporte, fez-se necessário avaliar estratégias que possibilitassem a dissolução da matriz ou a extração dessas espécies. Assim, inicialmente, avaliou-se a possibilidade de realizar a etapa de refluxo com o resíduo em contato com a solução absorvedora. Para isso, após a etapa de combustão (1 min

a 1400W), os frascos foram retirados do forno micro-ondas, despressurizados e os resíduos foram removidos dos suportes e colocados em contato direto com a solução absorvedora. Após isso, os frascos foram novamente fechados, fixados ao rotor e submetidos a etapa de refluxo (5 min a 1400 W). As soluções resultantes da combustão de 600 mg de suplemento multivitamínico/mineral a partir da realização da etapa de refluxo com o resíduo em contato direto com solução absorvedora ou contido no suporte da amostra foram analisadas por IC-DC e os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações das espécies quantificadas por IC-DC quando 600 mg de suplemento multivitamínico/mineral foram decompostos por MIC usando 25 bar de pressão de O₂, 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W com o resíduo no suporte ou em solução (média ± desvio padrão, n=3).

Analitos	Concentrações (mg kg ⁻¹)	
	Resíduo no suporte	Resíduo em solução
Ca ²⁺	17990 ± 4483	145322 ± 11223
Mg ²⁺	5720 ± 1213	29767 ± 2381
Mn ²⁺	< LOQ	882 ± 101
Na ⁺	1238 ± 282	2926 ± 264
Zn ²⁺	1012 ± 208	4762 ± 399

De acordo com os resultados observados na Tabela 5, é possível verificar que as concentrações das espécies quantificadas por IC-DC foram consideravelmente menores (até 88% menor para Ca²⁺) quando a etapa de refluxo foi realizada com o resíduo no suporte. A concentração de Mg²⁺, por exemplo, só foi quantificada quando o resíduo foi colocado em contato com a solução absorvedora. Além disso, RSDs elevados (> 20%) foram obtidos nessa condição. Por outro lado, as concentrações obtidas quando o resíduo foi colocado em contato com a solução absorvedora para a realização da etapa de refluxo, foram similares às concentrações informadas no rótulo da amostra SMVM-1 (Tabela 14 – Anexo A). Isso é um indicativo de que é realmente necessária a realização da etapa de refluxo com o resíduo da combustão do suplemento multivitamínico/mineral em contato com a solução absorvedora. Embora não tenha ocorrido a dissolução total do resíduo nesse caso, observaram-se

mudanças em seu aspecto e coloração. Isso está possivelmente atrelado a extração de espécies químicas aderidas ao resíduo inorgânico e/ou, até mesmo, devido a solubilização de alguns óxidos metálicos. Na Figura 16 é possível observar o aspecto das soluções resultantes após a realização desse ensaio, bem como do resíduo resultante da etapa de refluxo quando colocado em contato com a solução absorvedora.

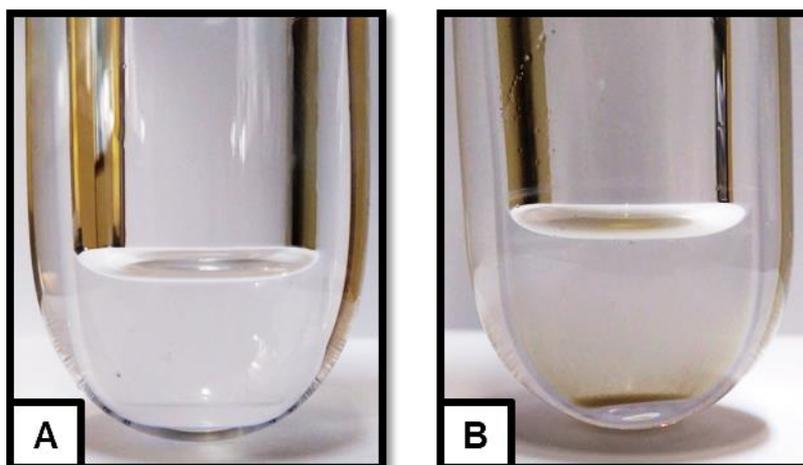


Figura 16. Aspecto das soluções obtidas após a decomposição de 600 mg de suplemento multivitamínico/mineral usando 25 bar de pressão de O_2 , 6 mL de $HNO_3:HCl$ (1,0:1,0 mol L^{-1}) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W com o resíduo no suporte **(A)** ou em contato com a solução absorvedora **(B)**.

Após ter sido constatada a necessidade de realizar a etapa de refluxo com o resíduo da combustão de suplemento multivitamínico/mineral em contato com a solução absorvedora, a influência do aumento da massa de amostra (600 a 1100 mg) foi avaliada para as espécies quantificadas por IC-DC. Os resultados referentes a essa avaliação são apresentados na Figura 17. Importante mencionar que previamente a etapa de determinação essas amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min a temperatura ambiente com o intuito de evitar entupimentos no sistema cromatográfico.

Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que as concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} não diferiram significativamente (ANOVA/teste de Tukey, nível de confiança de 95%) quando massas de 600 a 1100 mg de amostra foram decompostas por MIC sob as condições supracitadas. Apesar disso, notou-se um incremento nos RSDs com o aumento da massa de amostra. Por outro lado, as concentrações de Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} , obtidas quando 1100 mg de amostra foram digeridas por MIC,

apresentaram diferenças significativas daquelas obtidas quando massas iguais ou inferiores a 1000 mg foram decompostas. Além do descréscimo observado nas concentrações dessas espécies, os RSDs foram elevados ($\geq 13\%$) quando massas superiores a 1000 mg de suplemento multivitamínico/mineral foram submetidas a decomposição por MIC. Essa limitação pode estar relacionada à combustão inadequada da porção orgânica da matriz ou até mesmo a capacidade da solução absorvedora em reter os analitos. Assim, a massa de 1000 mg foi selecionada para as avaliações posteriores.

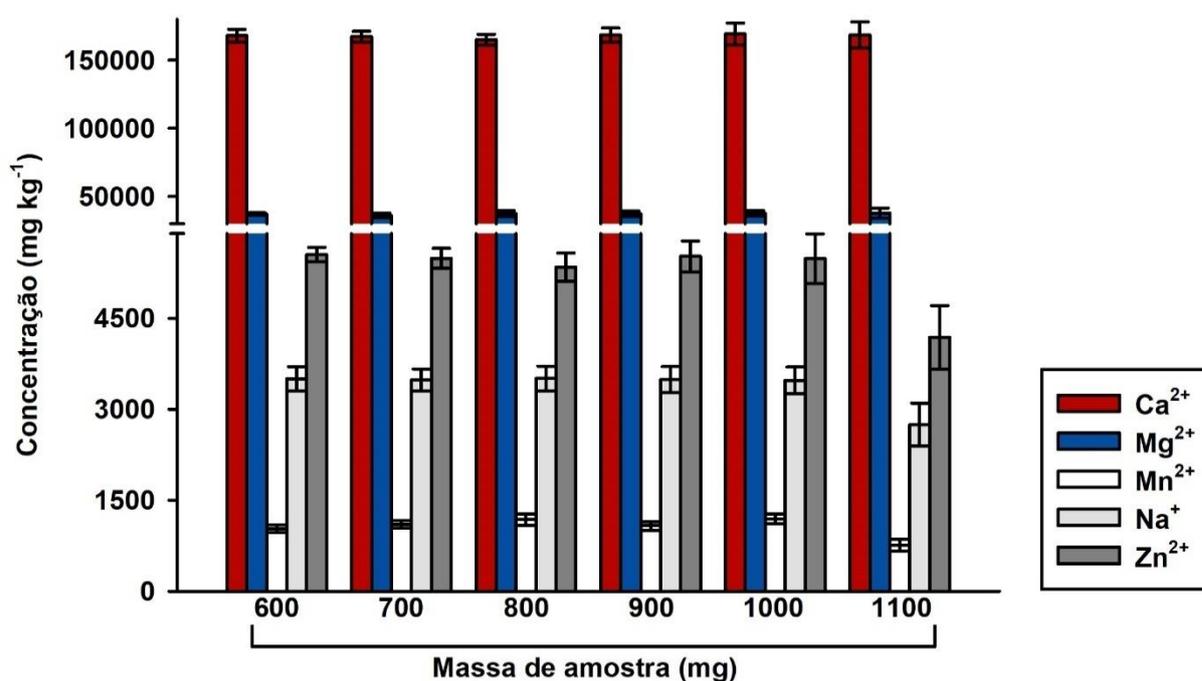


Figura 17. Influência do aumento da massa de amostra nas concentrações dos analitos quantificados por IC-DC após a decomposição de suplemento multivitamínico/mineral por MIC usando 25 bar de pressão de O₂, 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 10 min de tempo de refluxo a 1400 W.

Outro parâmetro avaliado na otimização da MIC para o preparo de amostras de suplementos multivitamínicos/minerais foi a etapa de refluxo no programa de irradiação com micro-ondas. Esse parâmetro foi estudado em virtude da combustão dessa matriz gerar uma quantidade considerável de resíduo. Além disso, com base nos resultados obtidos até o momento, verificou-se a necessidade desse resíduo ser colocado em contato com a solução absorvedora previamente a etapa de refluxo.

Cabe mencionar que, nesse caso, a solução absorvedora da MIC atua, também, como uma solução extratora. Portanto, o estudo do tempo de refluxo é extremamente importante para garantir a recuperação quantitativa dos analitos. Nesse estudo, foram avaliados tempos de refluxo de 5; 10; 15 ou 30 min, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 18.

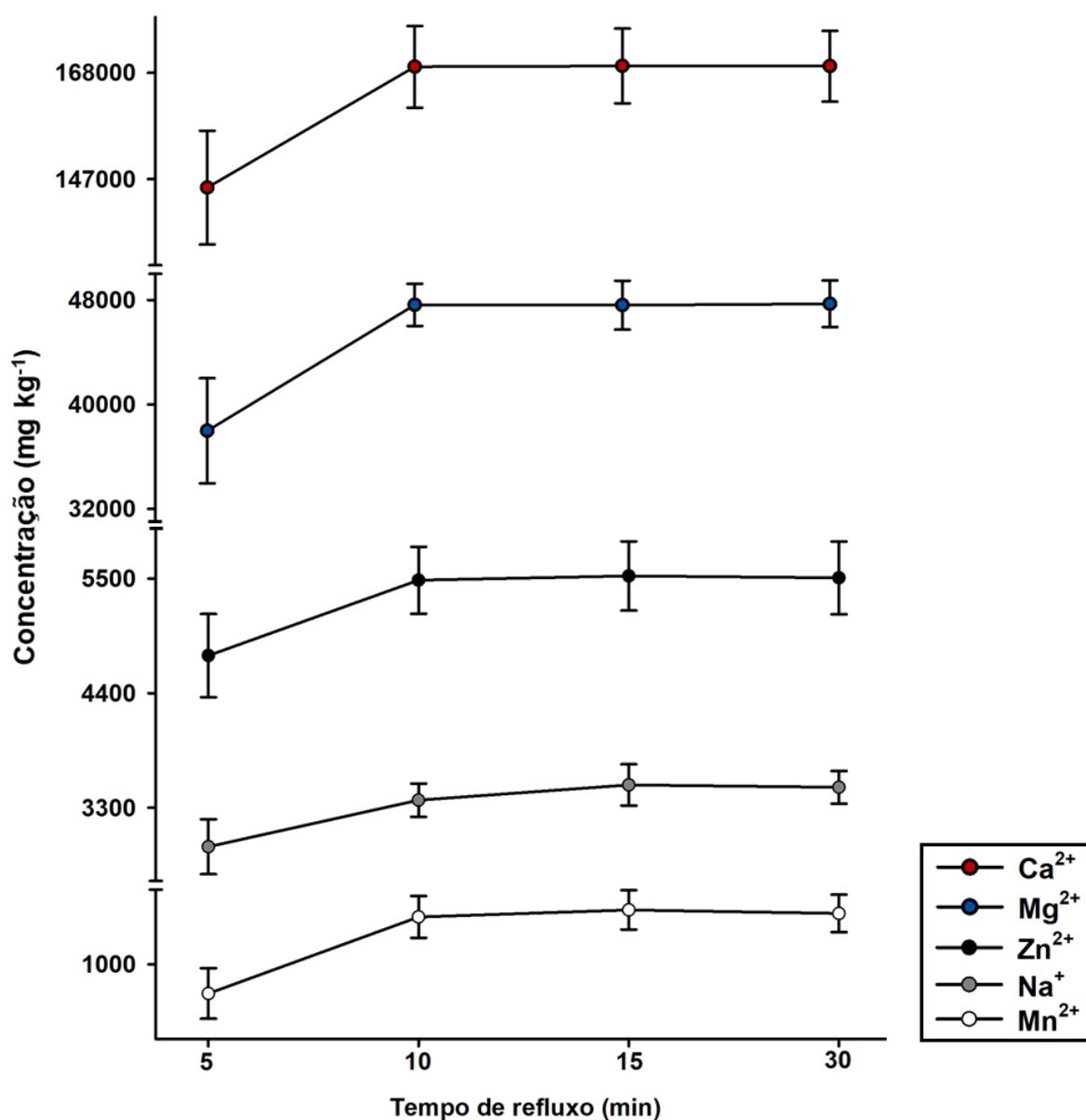


Figura 18. Influência do tempo de refluxo nas concentrações dos analitos quantificados por IC-DC após a decomposição de 1000 mg de suplemento multivitamínico/mineral por MIC usando 25 bar de pressão de O₂ e 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora (n=3).

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o tempo de refluxo de 5 min não foi eficiente para garantir a recuperação quantitativa das espécies quantificadas por IC-DC. É evidente a existência de uma tendência nas concentrações dessas espécies indicando a necessidade de no mínimo 10 min de tempo de refluxo para que não sejam observadas diferenças significativas nas concentrações dos analitos (ANOVA/teste de Tukey, nível de confiança de 95%). Sendo assim, o tempo de refluxo de 10 min foi selecionado para a realização dos ensaios visando avaliar a exatidão do método.

5.3.2.1 Avaliação da extração assistida por radiação micro-ondas

Em vista dos resultados obtidos na otimização da MIC para o preparo de amostras de suplementos multivitamínicos/minerais, um experimento adicional foi realizado com o intuito de verificar se a aplicação da etapa de combustão era imprescindível para garantir recuperações quantitativas dos analitos. Para isso, 500 mg de suplemento multivitamínico/mineral foram submetidos ao processo de extração assistida por radiação micro-ondas (MW-AE) usando 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução extratora. O programa de irradiação utilizado consistiu em: i) rampa de 10 min até 800 W; ii) 20 min a 800 W e iii) 20 min a 0 W (resfriamento). Esse foi o mesmo programa utilizado para a digestão das amostras pelo método adotado como referência, descrito no item 4.6.2 (Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)). A seleção de 500 mg de amostra para a realização desse experimento se deu pelo fato de somente ter sido possível quantificar Mn²⁺ – espécie que apresentou a menor concentração na amostra avaliada após decomposição por MIC – quando essa massa foi utilizada. Na Tabela 6 são apresentadas as concentrações dos analitos quantificados por IC-DC quando o procedimento de MW-AE ou MIC (usando as condições otimizadas) foi aplicado.

De acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 6, apenas Ca²⁺ e Mn²⁺ não apresentaram diferenças significativas (teste *t*-student, nível de confiança de 95%) quando o procedimento de MW-AE ou MIC foi utilizado no preparo de amostras de suplementos multivitamínicos/minerais. Esse fato pode indicar que tanto Ca²⁺ quanto Mn²⁺ estão presentes em maiores concentrações na porção inorgânica

dessa matriz, da qual é possível extrair os analitos sem a necessidade de uma etapa de combustão. Por outro lado, as concentrações de Mg^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} determinadas nas soluções resultantes da MW-AE foram estatisticamente diferentes daquelas obtidas por MIC. Ou seja, essas espécies devem, provavelmente, estar contidas em concentrações consideráveis na porção orgânica, de maneira que somente o processo de extração não é suficiente para garantir a disponibilização das espécies em solução. Isso quer dizer que, para a determinação dessas espécies, a etapa de combustão é, possivelmente, requerida para garantir recuperações quantitativas.

Tabela 6. Comparação das concentrações de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} determinadas por IC-DC após preparo da amostra por MW-AE ou MIC (média \pm desvio padrão, n=3).

Analitos	Concentração ($mg\ kg^{-1}$)	
	MW-AE	MIC
Ca^{2+}	171102 \pm 7891	169175 \pm 8083
Mg^{2+}	37203 \pm 2013	47618 \pm 1616
Mn^{2+}	1111 \pm 94	1190 \pm 82
Na^+	2838 \pm 182	3373 \pm 160
Zn^{2+}	4860 \pm 208	5485 \pm 321

5.3.3 Suplemento botânico

Assim como foi realizado para o suplemento multivitamínico/mineral, apenas a massa de amostra e o tempo de refluxo foram avaliados para essa matriz. Portanto, a pressão inicial de O_2 e a solução absorvedora utilizadas durante a avaliação da massa de amostra e do tempo de refluxo foram as mesmas que proporcionaram a obtenção dos melhores resultados na avaliação da MIC para a decomposição de suplementos hipercalóricos. Dessa forma, massas de amostra (SB-1) que variaram de 400 a 1100 mg foram decompostas por MIC utilizando 25 de bar de pressão inicial de O_2 , 6 mL de uma solução para a absorção dos analitos contendo HNO_3 1 mol L^{-1} e HCl 1 mol L^{-1} , e com 5 min de refluxo a 1400 W. Do mesmo modo que foi realizado para os outros suplementos, a avaliação preliminar da máxima massa de amostra a

ser decomposta por MIC foi feita com base no aspecto das soluções resultantes, como pode ser observado na Figura 19, na página 113. A pressão máxima atingida em cada condição também foi avaliada com o intuito de garantir a segurança operacional.

Após a combustão de uma massa de 1100 mg (maior massa avaliada) a pressão máxima atingida – usando 25 bar de pressão inicial de O₂ – foi de 39 ± 2 bar (n=3). Essa pressão é correspondente a 49% do valor máximo de pressão estabelecido em termos de segurança operacional (80 bar). Com relação ao aspecto das soluções apresentados na Figura 19, pode-se afirmar que decomposições eficientes foram obtidas até a massa de 1000 mg. Por outro lado, quando 1100 mg de amostra foram submetidos a decomposição por MIC, a solução apresentou aspecto levemente turvo e uma pequena quantidade de fuligem nas paredes do frasco. Isso ocorreu, provavelmente, devido a combustão incompleta da amostra. Da mesma maneira que a solução resultante da combustão de 1100 mg apresentou aspecto diferente das demais condições, o resíduo no suporte também demonstrou indicativos de que a combustão dessa massa de amostra por MIC não é eficiente. Os resíduos da combustão de 600, 700 e 800 mg foram similares entre si, diferindo apenas na quantidade. Por sua vez os resíduos da combustão de 900 e 1000 mg foram diferentes dos observados para a combustão de massas inferiores mas, também, diferentes do resíduo obtido após a combustão de 1100 mg. Embora o aspecto das soluções resultantes da queima de 900 e 1000 mg sejam límpidas, os aspectos dos resíduos no suporte indicam a possibilidade da combustão incompleta da amostra.

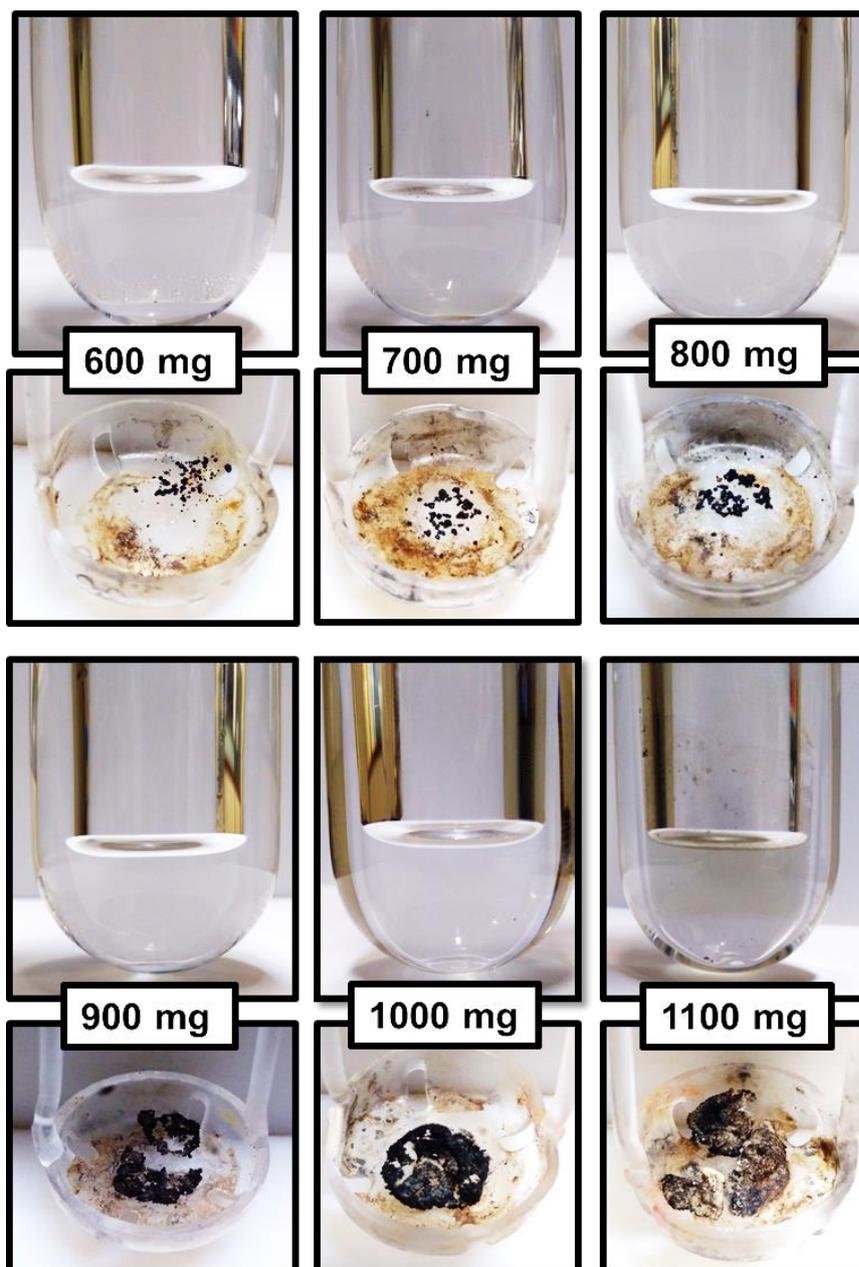


Figura 19. Aspecto das soluções obtidas e dos suportes após a digestão de massas crescentes de suplemento botânico (600 a 1100 mg) por MIC usando 25 bar de pressão de O_2 , $HNO_3:HCl$ (1,0:1,0 mol L^{-1}) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W.

Em vista dos resultados obtidos na otimização da MIC para o preparo de amostras de suplementos multivitamínicos/minerais, a estratégia de realizar a etapa de refluxo com o resíduo em contato com solução absorvedora também foi adotada para a decomposição de suplementos botânicos por MIC. A partir disso, constatou-se que a massa de 1100 mg de suplemento botânico não é eficientemente decomposta por MIC, como pode ser observado na Figura 20, que apresenta o aspecto das

soluções resultantes da decomposição de 1000 mg (a) ou 1100 mg (b) quando a etapa de refluxo foi realizada com o resíduo em contato com a solução absorvedora.

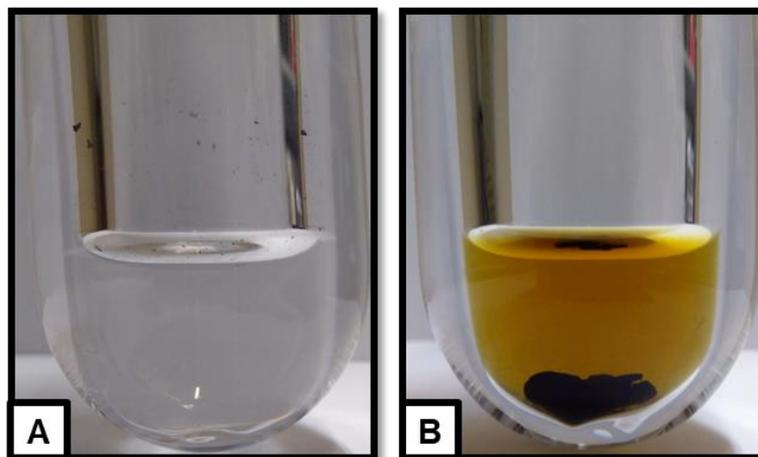


Figura 20. Aspecto das soluções resultantes da decomposição de 1000 mg (A) ou 1100 mg (B) usando 25 bar de pressão de O₂, HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora e 5 min de tempo de refluxo a 1400 W com o resíduo em contato com a solução absorvedora.

Devido ao aspecto amarelado e com resíduos da solução resultante da combustão de 1100 mg, somente as soluções obtidas pela decomposição de massas iguais ou inferiores a 1000 mg foram analisadas por IC-DC. Os resultados obtidos a partir da análise dessas soluções demonstraram que as concentrações das espécies que foram quantificadas (Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺) não diferiram estatisticamente (ANOVA/teste de Tukey, nível de confiança de 95%). Ou seja, até mesmo quando 900 e 1000 mg de suplemento botânico foram submetidos a combustão por MIC os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas das demais condições. Dessarte, a massa de 1000 mg de suplemento botânico foi selecionada como a condição mais adequada.

O tempo de refluxo foi avaliado da mesma forma que na otimização da MIC para o preparo de amostras de suplemento multivitamínico/mineral. Essa avaliação foi realizada tendo em vista que o resíduo resultante da combustão é transferido para a solução absorvedora previamente e etapa de refluxo. Ou seja, assim como foi observado anteriormente, quando o resíduo é colocado em contato com a solução absorvedora o tempo de refluxo deve ser criteriosamente avaliado. Como observado na otimização da MIC para o preparo de amostras de suplemento

multivitamínico/mineral, o tempo de refluxo pode influenciar na recuperação quantitativa dos analitos. Portanto, como pode ser observado na Figura 21, os tempos de refluxo de 5, 10, 15 ou 30 min foram avaliados.

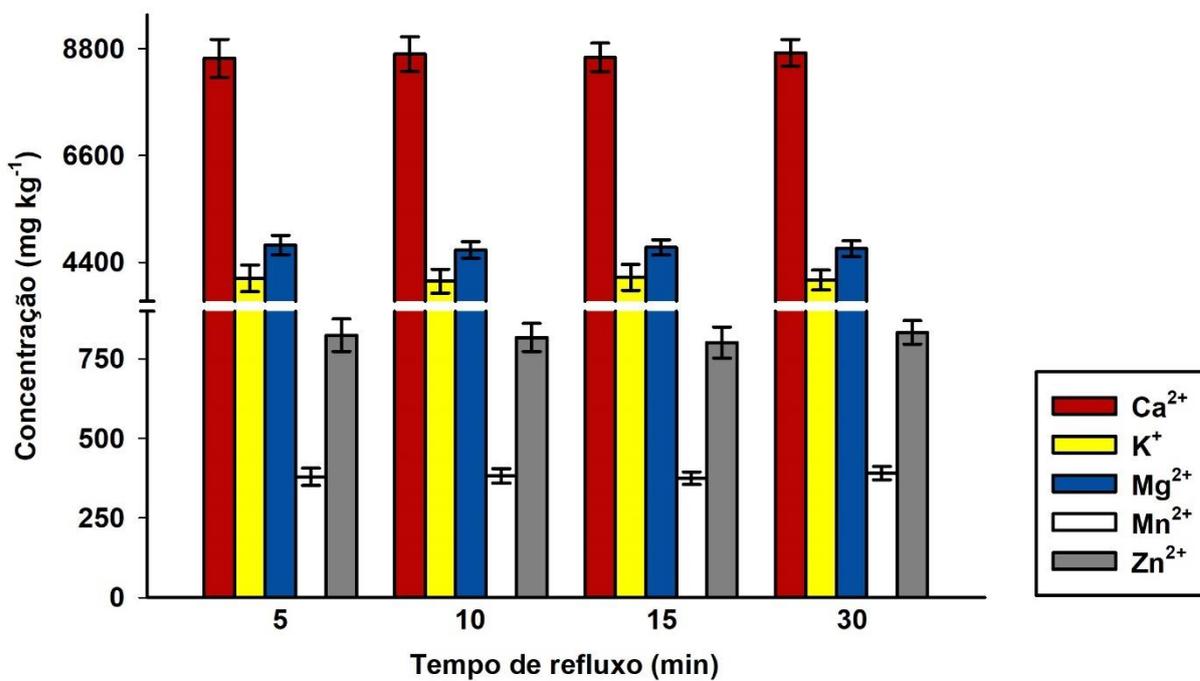


Figura 21. Influência do tempo de refluxo nas concentrações dos analitos quantificados por IC-DC após a decomposição de 1000 mg de suplemento botânico por MIC usando 25 bar de pressão de O₂ e 6 mL de HNO₃:HCl (1,0:1,0 mol L⁻¹) como solução absorvedora (n=3).

Diferentemente do que foi observado para a decomposição de 1000 mg de suplemento multivitamínico/mineral, o uso de 5 min de tempo de refluxo na decomposição de suplemento botânico por MIC foi suficiente para que não houvesse diferenças significativas nas concentrações dos analitos, como pode ser observado na Figura 21. Assim sendo, o tempo de refluxo de 5 min foi selecionado para a realização dos ensaios visando avaliar a exatidão do método.

5.3.4 Resumo dos parâmetros selecionados após a otimização da MIC

Assim como esperado, não foi possível estabelecer apenas um método para o preparo de amostras de suplementos hipercalóricos, multivitamínicos e/ou minerais e botânicos. Isso é devido as grandes diferenças observadas na composição de cada um desses produtos. Enquanto que os suplementos hipercalóricos podem apresentar em sua constituição mais de 90% de uma mistura de carboidratos e proteínas, os suplementos multivitamínicos e/ou minerais são constituídos, na maioria dos casos, de sais minerais, vitaminas e excipientes (celulose microcristalina). O suplemento botânico, por sua vez, é geralmente constituído de um extrato de planta, podendo ser enriquecido com sais minerais, vitaminas e/ou outras substâncias. Isto é, são produtos que apresentam a mesma finalidade – suplementar a dieta humana –, porém matrizes consideravelmente diferentes.

Ainda assim, após a avaliação da MIC para o preparo dessas matrizes, condições similares foram selecionadas. A pressão inicial de O₂ e a solução absorvedora, por exemplo, foram as mesmas para as três matrizes. A massa de amostra foi o parâmetro que proporcionou as maiores dificuldades durante a otimização da MIC. Em geral, na combustão das três matrizes foram observados resíduos no suporte, indicando a presença de compostos inorgânicos que não foram solubilizados durante a etapa de refluxo. No entanto, isso foi mais evidente durante a otimização da MIC para o preparo de amostras da matriz de suplemento multivitamínico/mineral. Na combustão de 1000 mg dessa matriz, por exemplo, uma grande quantidade de resíduo foi observada (~ 50% de acordo com o teor de cinzas determinado). Por essa razão que a estratégia de transferir o resíduo para a solução absorvedora, previamente a etapa de refluxo, foi adotada. Essa estratégia foi repetida durante a otimização da MIC para os suplementos botânicos, na qual também foi observada a presença de resíduo quando massas de amostras elevadas foram submetidas à decomposição. Esse procedimento não foi avaliado para os suplementos hipercalóricos, um vez que uma pequena quantidade de resíduo havia sido observada. Ainda assim, essa estratégia também foi adotada para essa matriz durante a realização dos experimentos visando à avaliação da exatidão do método. Ainda com relação à massa de amostra, cabe enfatizar que, dependendo da concentração dos analitos, massas de amostras menores também podem ser

utilizadas. No presente estudo, as massas mais elevadas foram selecionadas tendo em vista a obtenção de menores limites de detecção e quantificação.

Por fim, o tempo de refluxo também foi avaliado para as três matrizes e, de acordo com os resultados obtidos, somente o suplemento multivitamínico/mineral requereu tempo de refluxo superior a 5 min. Como comentado anteriormente, isso pode estar relacionado com a quantidade de resíduo resultante da combustão dessa matriz, que foi consideravelmente maior quando comparada com a quantidade de resíduo obtida após a combustão do suplemento hipercalórico ou botânico. Um resumo dos parâmetros selecionados após a otimização por MIC para o preparo de amostras de suplementos hipercalóricos, suplementos multivitamínicos/minerais e suplementos botânicos é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros selecionados após a otimização da MIC para o preparo de amostras suplementos hipercalóricos (SHP), suplementos multivitamínicos/minerais (SMVM) e suplementos botânicos (SB) visando à subsequente determinação de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} por IC-DC.

Parâmetros avaliados	Amostras		
	SHP	SMVM	SB
Massa de amostra (g)	0,7	1,0	1,0
Pressão inicial de O_2 (bar)	25	25	25
Solução absorvedora (mol L^{-1})	$\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (1,0:1,0)	$\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (1,0:1,0)	$\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (1,0:1,0)
Tempo de refluxo* (min)	5	10	5

* Etapa de refluxo realizada com o resíduo remanescente da combustão em contato com a solução absorvedora.

Ainda, é importante destacar que foi devido à possibilidade de se utilizar ácidos diluídos ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$ 1,0:1,0 mol L^{-1}) para o preparo dessas matrizes que a determinação dos analitos por IC-DC foi possível. Na Figura 22, são apresentados os cromatogramas referentes a análise das soluções resultantes da decomposição por MIC das três matrizes avaliadas neste trabalho, bem como de um branco analítico do procedimento e de um padrão multielementar da curva de calibração.

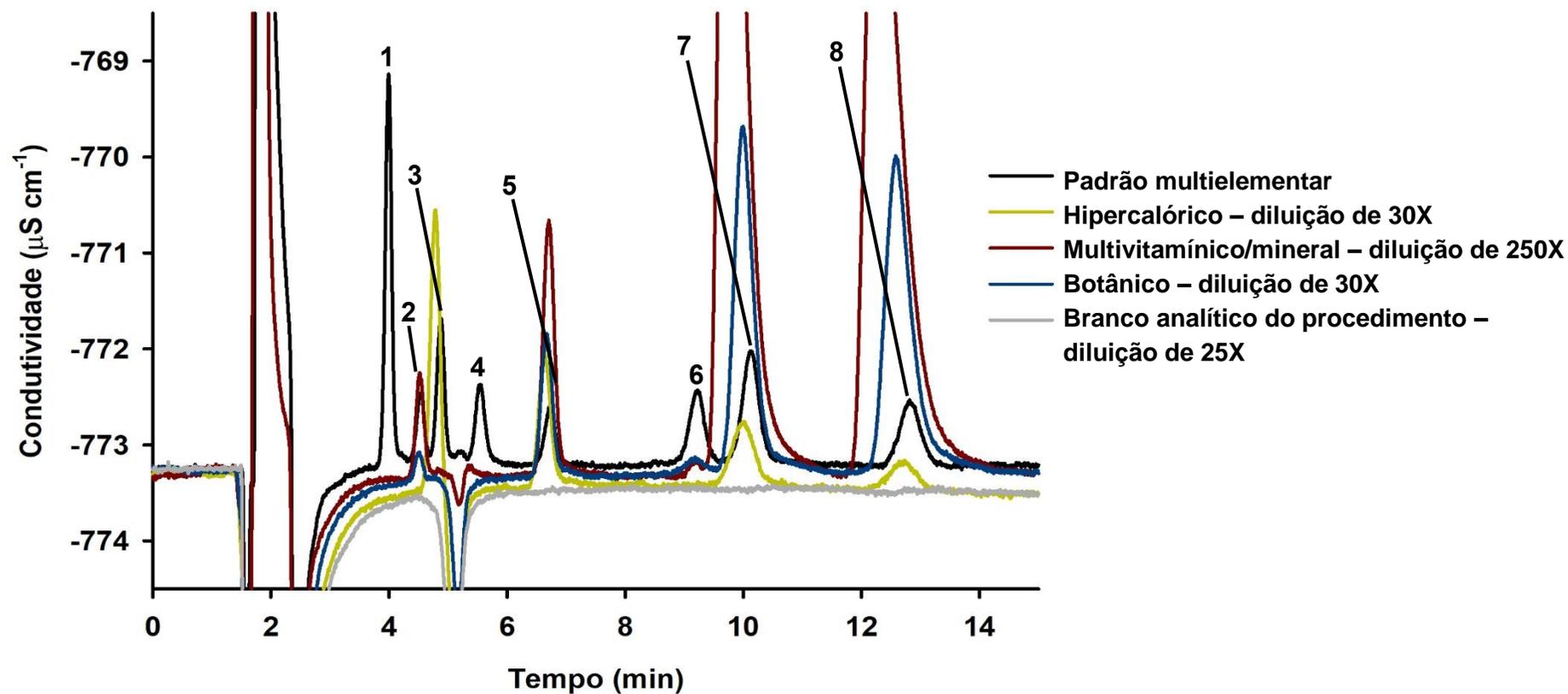


Figura 22. Cromatogramas obtidos a partir da análise das soluções resultantes do preparo das amostras de suplementos dietéticos pelos métodos propostos, de um branco analítico do procedimento e de um padrão multielementar contendo: 1) Li^+ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2) Zn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 3) Na^+ ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$); 4) Co^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 5) K^+ ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$); 6) Mn^{2+} ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); 7) Mg^{2+} ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e 8) Ca^{2+} ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em água, usando as condições cromatográficas selecionadas.

5.4 PARÂMETROS DE MÉRITO DOS MÉTODOS PROPOSTOS

Conforme descrito no item 4.8 (Avaliação dos parâmetros de mérito dos métodos propostos), parâmetros de mérito como os LODs e LOQs, e a faixa linear de trabalho foram determinados. Os resultados desses parâmetros são apresentados na Tabela 8.

Os coeficientes de determinação (R^2) foram sempre superiores a 0,999, demonstrando uma boa adequação do ajuste das curvas. Apesar disso, apenas esse parâmetro não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Nesse sentido, uma análise do gráfico de resíduos também foi realizada, assim como descrito por Ribeiro *et al.* (2008). A partir desses dados foi possível verificar que as curvas apresentaram distribuição uniforme, variância constante (homocedastidade) e ausência de amostras atípicas, o que comprova o adequado ajuste das curvas de calibração, ou seja, a faixa linear de trabalho selecionada foi adequada para a determinação dos analitos.

Além disso, como esperado, os LODs e LOQs obtidos para os métodos avaliados foram relativamente elevados, especialmente para os metais de transição (de até 357 mg kg^{-1} para Co^{2+} no suplemento hipercalórico). Isso está, provavelmente, relacionado com a baixa sensibilidade da IC-DC para a determinação de metais quando comparada as técnicas espectrométricas, ou até mesmo com a cromatografia de íons com detecção espectrofométrica. A necessidade da utilização de um fator de diluição de no mínimo 25 vezes para suprimir o efeito da acidez das soluções resultantes da MIC, também contribuiu consideravelmente para o aumento dos LODs e LOQs. Entretanto, pode-se considerar esses valores adequados para a proposta deste trabalho, uma vez que a concentração das espécies investigadas são, geralmente, bem maiores nesses produtos – principalmente no caso dos suplementos multivitamínicos e/ou minerais.

Tabela 8. Faixa linear de trabalho e coeficientes de determinação das curvas analíticas utilizadas para a determinação dos analitos por IC-DC. Limites de detecção e quantificação dos métodos propostos para a determinação de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} por IC-DC em suplementos hipercalóricos (SHP), suplementos multivitamínicos e/ou minerais (SMVM) e suplementos botânicos (SB) (n=10).

Analitos	Parâmetros de mérito					
	Faixa linear de trabalho (mg L^{-1})	R^2	LODs (mg kg^{-1})		LOQs (mg kg^{-1})	
			SHP	SMVM e SB	SHP	SMVM e SB
Ca^{2+}	0,10 – 10,0	0,99990	140	98	261	183
Co^{2+}	0,25 – 5,0	0,99956	160	112	357	250
K^+	0,10 – 10,0	0,99971	148	103	247	173
Li^+	0,10 – 1,0	0,99962	29	20	54	38
Mg^{2+}	0,10 – 10,0	0,99983	160	112	291	203
Mn^{2+}	0,25 – 5,0	0,99987	169	118	328	229
Na^+	0,10 – 10,0	0,99996	111	78	232	162
Zn^{2+}	0,25 – 5,0	0,99976	219	154	324	227

Importante mencionar que o uso de colunas comerciais de pré-concentração pode ser uma interessante alternativa para reduzir os LODs e LOQs. Ainda, cabe mencionar que os LODs e LOQs calculados para os suplementos multivitamínicos/minerais e suplementos botânicos foram menores que os obtidos para o suplemento hipercalórico devido a maior massa de amostra utilizada na etapa de preparo de amostra. Esse fato evidencia a importância da avaliação desse parâmetro durante essa etapa visando à obtenção de menores LODs e LOQs.

Por sua vez, a exatidão dos métodos propostos foi avaliada através de ensaios de recuperação com solução padrão e, adicionalmente, pela comparação dos resultados com os obtidos a partir de um método de referência (Sołtyk *et al.*, 2003; Krejčová *et al.*, 2006; Marrero *et al.*, 2013; Crizel, 2015). Os materiais de referência certificados (CRM) do National Institute of Standards and Technology (NIST), SRM 3252 (Protein Drink Mix), SRM 3280 (Multivitamin/Multielement Tablets) e SRM 3232 (Kelp Powder – *Thallus laminariae*) poderiam ter sido utilizados para avaliar a exatidão dos métodos propostos. No entanto, devido aos elevados custos de aquisição, esses CRMs não foram adquiridos. Apesar disso, a realização dos ensaios de recuperação em dois níveis de concentração e, principalmente, a comparação dos resultados com os obtidos a partir de um método de referência podem ser considerados adequados para indicar a exatidão dos métodos propostos. A seguir serão descritos os resultados relativos à avaliação da exatidão dos métodos propostos.

5.4.1 Ensaios de recuperação com solução padrão

Os ensaios de recuperação foram realizados em dois níveis de concentração para cada matriz avaliada (suplemento hipercalórico, suplemento botânico e suplemento multivitamínico/mineral): 50% e 100% da concentração dos analitos quantificados nas amostras ou a concentração equivalente ao LOQ e 2LOQ, quando não quantificados (ANVISA, 2017), assim como detalhado no item 4.8 (Avaliação dos parâmetros de mérito dos métodos propostos). Os resultados obtidos para essa avaliação são apresentados na Tabela 9, na próxima página.

As médias das recuperações obtidas para os analitos nos dois níveis de concentração avaliados variaram entre 91 e 104% para o suplemento hipercalórico;

entre 92 e 107% para o suplemento multivitamínico/mineral e entre 93 e 105% para o suplemento botânico. Essas recuperações foram consideradas adequadas levando em consideração a faixa aceitável selecionada para este estudo (90 a 110%) (DUYCK *et al.*, 2002). Os ensaios de recuperação na amostra de suplemento multivitamínico/mineral objetivando a avaliação das concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} não foram realizados tendo em vista as elevadas concentrações dessas espécies na amostra em estudo. Nesse caso, a avaliação da exatidão foi realizada somente pela comparação dos resultados com os obtidos pelo método de referência. Além disso, cabe destacar que durante a realização desses ensaios, os RSDs foram sempre iguais ou inferiores a 5%.

Tabela 9. Recuperações para Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} após decomposição de suplemento hipercalórico (SHP), suplemento multivitamínico/mineral (SMVM) e suplemento botânico (SB) por MIC utilizando as condições previamente selecionadas e subsequente determinação por IC-DC (média \pm desvio, %, n=3).

Analitos	Amostras					
	SHP		SMVM		SB	
	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2	Nível 1	Nível 2
Ca^{2+}	96 \pm 3	91 \pm 3	n.d.	n.d.	98 \pm 1	103 \pm 2
Co^{2+}	91 \pm 3	97 \pm 2	103 \pm 2	94 \pm 4	102 \pm 4	105 \pm 3
K^+	101 \pm 3	104 \pm 4	107 \pm 2	97 \pm 4	101 \pm 4	94 \pm 3
Li^+	93 \pm 2	98 \pm 3	101 \pm 4	94 \pm 3	98 \pm 3	97 \pm 2
Mg^{2+}	95 \pm 4	102 \pm 3	n.d.	n.d.	103 \pm 2	98 \pm 3
Mn^{2+}	94 \pm 3	96 \pm 2	101 \pm 5	92 \pm 4	102 \pm 2	105 \pm 3
Na^+	95 \pm 2	103 \pm 4	93 \pm 2	95 \pm 5	104 \pm 3	97 \pm 2
Zn^{2+}	100 \pm 4	95 \pm 2	94 \pm 4	92 \pm 3	96 \pm 3	93 \pm 4

n.d.: não determinado.

5.4.2 Comparação dos métodos propostos com método de referência

De maneira complementar a realização dos ensaios de recuperação, os métodos propostos foram comparados com um método de referência (MW-AD com HNO₃ concentrado e posterior determinação dos analitos por ICP-OES) para verificar a exatidão dos resultados. Os resultados dessa avaliação são apresentados na Tabela 10.

As concentrações de Co²⁺ e Li⁺ não foram quantificadas por IC-DC em nenhuma das amostras após o preparo por MIC. Além dessas, as concentrações de Mn²⁺ e Zn²⁺ no suplemento hipercalórico (SHP-1), a concentração de K⁺ no suplemento multivitamínico/mineral (SMVM-1) e a concentração de Na⁺ no suplemento botânico (SB-1), também não foram quantificadas por IC-DC após o preparo por MIC. Portanto, não foi possível a comparação dos resultados nesses casos. Apesar disso, em todos esses casos foi possível avaliar a exatidão através dos ensaios de recuperação e os resultados obtidos foram satisfatórios, conforme apresentado na Tabela 9 do item 5.4.1 (Ensaio de recuperação com solução padrão). Nos demais casos foi possível realizar a comparação dos resultados e, após avaliação estatística (teste *t*-student, nível de confiança de 95%), não foram observadas diferenças significativas nas concentrações dos analitos quando os métodos propostos ou o método de referência foram aplicados.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, é possível afirmar que os métodos propostos apresentaram exatidão e precisão adequadas para a determinação de todas as espécies avaliadas. As concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺, por exemplo, que não haviam sido avaliadas através da realização dos ensaios de recuperação, não diferiram dos resultados obtidos pelo método de referência.

Tabela 10. Resultados obtidos após decomposição de suplemento hipercalórico (SHP), multivitamínico/mineral (SMVM) e botânico (SB) por MIC utilizando as condições previamente selecionadas e subsequente determinação por IC-DC, com os obtidos pelo método de referência (MW-AD e ICP OES) (média \pm desvio padrão, mg kg⁻¹, n = 3).

Analitos	Amostras					
	SHP-1		SMVM-1		SB-1	
	Referência	Proposto	Referência	Proposto	Referência	Proposto
Ca ²⁺	672 \pm 33	680 \pm 25	169974 \pm 10526	169175 \pm 8083	8657 \pm 342	8688 \pm 357
Co ²⁺	\leq 0,42*	\leq 357*	0,45 \pm 0,03	\leq 250*	0,91 \pm 0,05	\leq 250*
K ⁺	2625 \pm 212	2769 \pm 97	120 \pm 11	\leq 173*	4340 \pm 283	4010 \pm 248
Li ⁺	\leq 0,18*	\leq 54*	\leq 0,18*	\leq 38*	\leq 0,18*	\leq 38*
Mg ²⁺	766 \pm 30	724 \pm 16	46116 \pm 4701	47618 \pm 1616	4419 \pm 193	4652 \pm 170
Mn ²⁺	\leq 0,19*	\leq 328*	1126 \pm 84	1190 \pm 82	361 \pm 16	382 \pm 23
Na ⁺	2534 \pm 127	2667 \pm 85	3160 \pm 190	3373 \pm 160	82 \pm 5	\leq 162*
Zn ²⁺	34 \pm 2	\leq 324*	5562 \pm 363	5485 \pm 321	871 \pm 64	817 \pm 44

* LOQ.

O uso da MIC associada a determinação de metais por IC-DC apresenta algumas vantagens quando comparado ao método de referência e a outros métodos comumente utilizados para a análise de suplementos dietéticos que devem ser ressaltadas. Na Tabela 11 são apresentadas as principais características dos métodos propostos e do método de referência para fins de comparação.

Tabela 11. Principais características dos métodos propostos e do método de referência para a determinação de metais em suplementos dietéticos.

Parâmetro	Métodos propostos			Método de referência
	SHP	SMVM	SB	
Massa de amostra (g)	0,7	1,0	1,0	0,5
Tempo de preparo de amostra ¹	30	35	30	60
RSD (%)	≤ 4	≤ 7	≤ 7	≤ 10
Reagentes	6 mL de HNO ₃ :HCl 1:1 mol L ⁻¹ 50 µL de NH ₄ NO ₃ 6 mol L ⁻¹			6 mL de HNO ₃ concentrado
Nº de amostras preparadas por hora ²	Até 16			Até 8
Técnica de determinação	IC-DC			ICP OES

¹ incluindo o tempo de resfriamento; ² pode variar de acordo com o sistema utilizado.

Enquanto que o método de referência, que utiliza a MW-AD para o preparo de amostras, requer o uso ácido concentrado concentrado para o preparo de amostras, a MIC possibilitou o eficiente preparo de amostras de suplementos hipercalóricos, multivitamínicos/minerais e botânicos a partir do uso de reagentes diluídos. Isso permite a redução do manuseio de reagentes concentrados, assim como da geração e da periculosidade dos resíduos gerados, o que é extremamente importante, especialmente, para a análise de rotina. Além disso, as soluções resultantes do preparo de amostras com ácidos diluídos são compatíveis com a maioria das técnicas analíticas para a determinação de metais. É justamente em virtude disso que a IC-DC pôde ser utilizada com sucesso para a determinação dos analitos.

As soluções resultantes do preparo de amostra por MIC poderiam ser analisadas, por exemplo, por ICP OES, o que resultaria em uma redução considerável nos LODs e LOQs. No entanto, a ICP OES apresenta elevado custo de aquisição e, principalmente, de manutenção, uma vez que requer argônio para operação. Além disso, a sensibilidade da ICP OES não é requerida, na maioria dos casos, para o controle da concentração dessas espécies em suplementos dietéticos. Isso ocorre porque as concentrações a serem monitoradas são, geralmente, superiores aos LOQs obtidos para os métodos propostos neste trabalho, por exemplo. Outro fato que merece destaque é o tempo de preparo de amostra dos métodos propostos que pode ser de até metade do tempo requerido pelo método de referência, como pode ser verificado na Tabela 11. A precisão dos métodos propostos é outra característica que se sobressai frente ao método de referência. Portanto, é evidente o potencial de aplicação dos métodos propostos no controle de qualidade de suplementos dietéticos no que tange o controle da concentração de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} .

5.5 APLICABILIDADE DOS MÉTODOS PROPOSTOS VISANDO À DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

Após todas as avaliações requeridas para a otimização e avaliação dos parâmetros de mérito, as amostras descritas no Quadro 2 do item 4.4 (Amostras) foram utilizadas para demonstrar a exequibilidade dos métodos propostos. No total, 12 suplementos dietéticos foram analisados, sendo cinco suplementos hipercalóricos (SHP-1, SHP-2, SHP-3, SHP-4 e SHP-5), três suplementos multivitamínicos/minerais (SMVM-1, SMVM-2 e SMVM-3) e quatro suplementos botânicos (SB-1, SB-2, SB-3 e SB-4). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12 (suplementos hipercalóricos, na página 128) e na Tabela 13 (suplementos multivitamínicos/minerais e suplementos botânicos, na página 129).

Inicialmente, é importante destacar que as concentrações de Co^{2+} e Li^+ não foram quantificadas pelos métodos propostos em nenhuma das amostras de suplementos dietéticos analisadas neste trabalho. Isso se deve as baixas concentrações dessas espécies nessas amostras, uma vez que não foram

quantificadas (com exceção do Li na amostras SB-1) nem mesmo quando o método de referência – que utiliza a ICP OES para a determinação – foi aplicado para avaliação da exatidão nas amostras SHP-1, SMVM-1 e SB-1. Cabe mencionar que tanto Co quanto Li são minerais que ainda não apresentam função bem estabelecida no organismo humano.

O Co é um componente da vitamina B12 e as principais fontes de ingestão deste micromineral são o trigo sarraceno, o figo e outros vegetais de coloração verde. Sua função no organismo se assemelha a do Fe, no entanto a forma como atua ainda não é totalmente conhecida (TOLONEN, 1990; GAD, 2005a). Por outro lado, o Li é conhecido por seu uso (geralmente na forma de Li_2CO_3) no tratamento do transtorno bipolar. Apesar disso, esse elemento apresenta funções fisiológicas similares as do K e Na, sendo por essa razão também considerado um elemento essencial em nível traço por alguns autores (DISILVESTRO, 2004; GAD, 2005b). É importante mencionar que tanto Co quanto Li são minerais que ainda não apresentam função bem estabelecida no organismo humano.

Apesar de tudo, existem suplementos dietéticos no mercado alegando a suplementação dessas espécies. Os suplementos dietéticos de Li mais comuns são compostos de orotato ou aspartato de lítio, enquanto que os de Co contêm o gluconato de cobalto. Embora nenhum desses suplementos tenha sido analisado neste trabalho, acredita-se que o método proposto para análise de suplementos multivitamínicos e/ou minerais seria adequado e, provavelmente, possibilitaria o adequado controle da concentração dessas espécies.

Tabela 12. Concentrações de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} em suplementos hipercalóricos de variadas marcas obtidas após a digestão das amostras por MIC e determinação por IC-DC (média \pm desvio padrão, mg kg^{-1} , $n = 3$).

Analitos	Amostras				
	SHP-1	SHP-2	SHP-3	SHP-4	SHP-5
Ca^{2+}	680 \pm 25	1305 \pm 49	1577 \pm 67	\leq 261*	3178 \pm 123
Co^{2+}	\leq 357*	\leq 357*	\leq 357*	\leq 357*	\leq 357*
K^+	2769 \pm 97	1740 \pm 64	1394 \pm 45	301 \pm 11	897 \pm 36
Li^+	\leq 54*	\leq 54*	\leq 54*	\leq 54*	\leq 54*
Mg^{2+}	724 \pm 16	351 \pm 15	405 \pm 14	\leq 291*	1000 \pm 29
Mn^{2+}	\leq 328*	\leq 328*	\leq 328*	\leq 328*	\leq 328*
Na^+	2667 \pm 85	1978 \pm 42	784 \pm 27	881 \pm 31	3178 \pm 114
Zn^{2+}	\leq 324*	\leq 324*	\leq 324*	\leq 324*	\leq 324*

*LOQ.

Com relação as amostras de suplemento hipercalórico, é possível notar que somente as espécies Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e Na^+ foram quantificadas de acordo com a Tabela 12. Esse resultado era esperado, uma vez que esses produtos não são enriquecidos com minerais. Ou seja, as espécies quantificadas são constituintes da matriz, que é composta, majoritariamente, de carboidratos e proteínas. Apesar disso, como demonstrado durante a avaliação da exatidão, o método proposto pode ser adequado para a determinação das demais espécies metálicas em produtos que são enriquecidos com minerais. Com relação as concentrações das espécies quantificadas nessa matriz, ressalta-se que não foram observadas grandes variações (de \leq 261 a 3178 mg kg^{-1} para Ca^{2+} ; de 301 a 2769 mg kg^{-1} para K^+ ; de \leq 291 a 1000 mg kg^{-1} para Mg^{2+} e de 784 a 3178 mg kg^{-1} para Na^+) quando comparadas as observadas para os suplementos multivitamínicos/minerais e para os suplementos botânicos.

Os resultados obtidos foram comparados com aqueles informados nos rótulos dos produtos usados neste trabalho e que estão apresentados de maneira resumida na Tabela 14 (no Anexo A). As concentrações de K não foram informadas por nenhum dos fabricantes, embora se trate de um elemento essencial para o organismo humano em concentrações adequadas. Por essa razão, não foi possível comparar a concentração deste elemento nas amostras de suplementos dietéticos analisadas.

Tabela 13. Concentrações de Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} em suplementos multivitamínicos/minerais e de suplementos botânicos de variadas marcas obtidas após a digestão das amostras por MIC e determinação por IC-DC (média \pm desvio padrão, mg kg^{-1} , $n = 3$).

Analitos	Amostras						
	SMVM-1	SMVM-2	SMVM-3	SB-1	SB-2	SB-3	SB-4
Ca^{2+}	169175 \pm 8083	1623 \pm 114	137396 \pm 9275	8688 \pm 357	11990 \pm 240	188 \pm 7	100508 \pm 4462
Co^{2+}	$\leq 250^*$	$\leq 250^*$	$\leq 250^*$	$\leq 250^*$	$\leq 250^*$	$\leq 250^*$	$\leq 250^*$
K^+	$\leq 173^*$	$\leq 173^*$	30947 \pm 2138	4010 \pm 248	3807 \pm 235	6104 \pm 195	247 \pm 14
Li^+	$\leq 38^*$	$\leq 38^*$	$\leq 38^*$	$\leq 38^*$	$\leq 38^*$	$\leq 38^*$	$\leq 38^*$
Mg^{2+}	47618 \pm 1616	$\leq 203^*$	96855 \pm 4194	4652 \pm 170	7336 \pm 231	306 \pm 22	46302 \pm 2759
Mn^{2+}	1190 \pm 82	7616 \pm 553	1868 \pm 124	382 \pm 23	556 \pm 41	$\leq 229^*$	579 \pm 33
Na^+	3373 \pm 160	18773 \pm 1159	$\leq 162^*$	$\leq 162^*$	1075 \pm 43	1297 \pm 84	2090 \pm 67
Zn^{2+}	5485 \pm 321	32543 \pm 2302	16007 \pm 754	817 \pm 44	1395 \pm 75	$\leq 227^*$	3838 \pm 128

*LOQ.

Para as amostras de suplementos hipercalóricos apenas as concentrações de Ca^{2+} , para a amostra SHP-2, e Mg^{2+} , para as amostras SHP-1 e SHP-2, não diferiram estatisticamente (teste *t*-student, nível de confiança de 90%) das concentrações informadas nos rótulos. Deve-se dar destaque as concentrações obtidas para Mg^{2+} e Na^+ na amostra SHP-5, assim como as de Ca^{2+} e Mg^{2+} na amostra SHP-3, que apresentaram concentrações de 44 até 150% maiores que as informadas nos rótulos.

Com respeito aos resultados da Tabela 13, foi possível verificar que, como comentado anteriormente, as concentrações de Co^{2+} e Li^+ não foram quantificadas e nenhuma das amostras através dos métodos propostos. As concentrações de K^+ (SMVM-1 e SMVM-2), Mg^{2+} (SMVM-2), Mn^{2+} (SB-3), Na^+ (SMVM-3 e SB-1) e Zn^{2+} (SB-3) também não foram quantificadas em alguns casos isolados. Assim como descrito anteriormente, as concentrações de K não são informadas pelos fabricantes. Adicionalmente, as concentrações de Na nas amostras descritas na Tabela 13 também não são informadas pelos respectivos fabricantes. Outro fato que deve ser mencionado é que as amostras SB-3 e SB-4 não apresentam informações para nenhum dos elementos avaliados. Assim, a comparação dos resultados foi realizada somente para Ca, Mg, Mn e Zn nas demais amostras.

As concentrações desses elementos variaram em uma ampla faixa de concentração para os suplementos multivitamínicos/minerais (de 1623 a 169175 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Ca^{2+} ; de ≤ 173 a 30947 mg kg^{-1} para K^+ ; de ≤ 203 a 96855 mg kg^{-1} para Mg^{2+} ; de 1190 a 7616 mg kg^{-1} para Mn^{2+} e de 5485 a 32543 mg kg^{-1} para Zn^{2+}) e para os suplementos botânicos (de 188 a 100508 mg kg^{-1} para Ca^{2+} ; de 247 a 6104 mg kg^{-1} para K^+ ; de 306 a 46302 mg kg^{-1} para Mg^{2+} ; de ≤ 229 a 579 mg kg^{-1} para Mn^{2+} e de ≤ 227 a 3838 mg kg^{-1} para Zn^{2+}). Enquanto que para os suplementos multivitamínicos/minerais apenas a concentração de Ca^{2+} na amostra SMVM-1 não diferiu estatisticamente do valor informado no rótulo (teste *t*-student, nível de confiança de 90%), para os suplementos botânicos isso aconteceu somente para Ca^{2+} e Zn^{2+} na amostra SB-1. Ou seja, todas as demais concentrações determinadas foram estatisticamente diferentes das informadas nos rótulos em um nível de confiança de 90%. Da mesma forma que foi evidenciado para os suplementos hipercalóricos, as concentrações obtidas em alguns casos foram consideravelmente superiores as informadas nos rótulos. Para os suplementos multivitamínicos/minerais se destacam as concentrações de Mn^{2+} e Zn^{2+} nas amostras SMVM-2 e SMVM-3 que foram de 90 até 242% maiores que as informadas. Já para os suplementos botânicos, deve-se

evidenciar as concentrações de Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} na amostra SB-2 que foram de 68 até 120% maiores que aquelas descritas no rótulo deste produto.

5.6 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO FINAL

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho, oriundos das atividades realizadas no laboratório, foram acondicionados, rotulados e, por fim, encaminhados para o sistema de coleta de resíduos da universidade. Em suma, dois tipos de resíduos foram gerados: i) resíduos provenientes da etapa de preparo de amostras e ii) resíduos provenientes da determinação dos analitos por IC-DC.

Os resíduos oriundos da etapa de preparo de amostras eram constituídos majoritariamente de HNO_3 concentrado, que foi utilizado na descontaminação do sistema de decomposição. Esses resíduos foram neutralizados utilizando NaOH 15% (m/v) até pH próximo a 7,0. Nesta condição, tem-se a neutralidade da solução (com a presença de sais e água), possibilitando melhores condições para a manipulação e descarte. Por sua vez, os resíduos do sistema cromatográfico – constituídos de soluções contendo ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido dipicolínico), acetonitrila e pequenos volumes das amostras injetadas no sistema cromatográfico – foram, assim como os demais resíduos gerados, acondicionados e rotulados de acordo com a composição majoritária. Como mencionado, todos os resíduos foram encaminhados para o sistema de coleta de resíduos da universidade, que mantém em vigor contrato com empresa especializada nos serviços de coleta, transporte, tratamento e destinação final de resíduos biológicos e químicos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, foi possível constatar a eficiência da MIC no preparo de amostras de suplementos dietéticos visando à posterior determinação de metais por IC-DC. Embora não tenha sido possível estabelecer apenas um método para a determinação dessas espécies em suplementos dietéticos devido as grandes diferenças de composição das matrizes avaliadas, o objetivo principal deste trabalho foi alcançado. Isto é, neste trabalho três métodos foram propostos para a determinação de metais por IC-DC: 1) suplemento hipercalórico; 2) suplemento multivitamínico e/ou mineral e 3) suplemento botânico. Apesar disso, os únicos parâmetros que diferenciaram os métodos propostos foram a massa de amostra e o tempo de refluxo no programa de irradiação com micro-ondas.

A otimização dos parâmetros instrumentais relativos à determinação de metais por IC-DC foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Essa técnica oferece vantagens quando comparadas com as técnicas de espectrometria atômica comumente empregadas como, por exemplo, o baixo custo de aquisição e manutenção e, por isso, pode ser considerada ideal para a análise de rotina. Combinado a isso, deve-se levar em consideração que, embora a IC-DC apresente relativa baixa sensibilidade para a determinação de metais, especialmente os de transição, os suplementos dietéticos são amostras que, geralmente, apresentam elevadas concentrações desses elementos. Assim, o uso de técnicas de elevada sensibilidade, como a ICP OES, pode não ser a melhor estratégia neste caso, principalmente devidos aos elevados custos envolvidos para a aquisição a manutenção do equipamento.

Como enfatizado no decorrer deste trabalho, a determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição por IC-DC (utilizando um sistema compacto com eluição isocrática) apresenta uma série de desafios. Isso é comprovado pelos poucos trabalhos na literatura demonstrando esse tipo de determinação. No entanto, embora não tenha sido possível a determinação adicional de Cu^{2+} e Fe^{2+} por IC-DC a partir da coluna cromatográfica usada neste trabalho, o método cromatográfico desenvolvido proporcionou a adequada separação e quantificação de 8 espécies metálicas em menos de 15 minutos.

Por outro lado, como pôde ser verificado, a IC-DC é muito suscetível a interferências relacionadas a concentração ácida das amostras. É, provavelmente, por esse motivo que a técnica tem sido aplicada de forma predominante para a determinação de metais em amostras líquidas, as quais não necessitam de métodos exaustivos de preparo de amostras. Ou seja, é a primeira vez que um método cromatográfico que possibilita a determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição é passível de realizar a análise de soluções resultantes da decomposição de matrizes sólidas complexas, como as dos suplementos dietéticos avaliados. Isso só foi possível devido a utilização da MIC para o preparo das amostras, a qual possibilitou o uso de uma solução diluída ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$ 1:1 mol L^{-1}) para a absorção dos analitos e, em consequência disso, minimizou o efeito da acidez e possibilitou a adequada determinação dos analitos por IC-DC. Importante ressaltar que o uso de reagentes diluídos reduz o manuseio de reagentes concentrados, assim como a geração e a periculosidade dos resíduos gerados, o que é de extrema importância na análise de rotina. Os métodos desenvolvidos apresentaram exatidão e precisão satisfatórias, bem como LODs e LOQs que, apesar de serem relativamente elevados, mostraram-se adequados para a finalidade proposta.

Com relação a aplicabilidade dos métodos propostos, destacam-se as discrepâncias observadas entre os valores determinados e informados. As amplas faixas de variação na concentração dos analitos e as discordâncias observadas entre as concentrações determinadas e informadas estão, presumivelmente, relacionados ao uso de métodos analíticos inadequados para o controle de qualidade desses produtos. Esses resultados são alarmantes, no entanto, se considerarmos apenas a ingestão dos suplementos analisados neste trabalho, as concentrações determinadas não são suficientes para ocasionar problemas para o organismo a curto prazo levando em consideração a IDR de cada elemento. Em contrapartida, o consumo contínuo ao longo dos anos pode ocasionar problemas de saúde. Ainda, cabe ressaltar que esses produtos são facilmente adquiridos sem a necessidade de prescrição médica, e são usualmente consumidos sem supervisão, o que aumenta os riscos. Esses fatos evidenciam a importância do desenvolvimento de métodos analíticos precisos e exatos para um efetivo controle de qualidade com o intuito de garantir a segurança alimentar dos consumidores.

REFERÊNCIAS

ABE-MATSUMOTO, L. T.; SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, p.1371-1380, 2015.

AMMANN, A. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. **Journal of Mass Spectrometry**, v.42, n.4, p.419-427, 2007.

ANTON PAAR. Microwave Reaction System: Multiwave 3000®, Austria. Disponível em: < <https://www.anton-paar.com/br-pt/produtos/grupo/preparacao-da-amostra/>>. Acesso em: julho 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. v.1. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5ª+edição+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>. Acesso em: agosto 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução normativa 28/2018e**. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=27/07/2018&jornal=515&pagina=141&totalArquivos=274>>. Acesso em: setembro 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: setembro 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 239, de 26 de julho de 2018a**. Disponível em: <http://www.impresanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380515/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-239-de-26-de-julho-de-2018-34380387>. Acesso em: setembro 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 240, de 26 de julho de 2018b**. Disponível em: <http://www.impresanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379904/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-240-de-26-de-julho-de-2018-34379893>. Acesso em: setembro 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018c**. Disponível em: <http://www.impresanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da>

[diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900](#)>. Acesso em: setembro 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 242, de 26 de julho de 2018d**. Disponível em: <http://www.imprensanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380552/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-242-de-26-de-julho-de-2018-34380517>. Acesso em: setembro 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018f**. Disponível em: <http://www.imprensanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917>. Acesso em: setembro 2018.

APPLEGATE, E. A.; GRIVETTI, L. E. Search for the Competitive Edge: A History of Dietary Fads and Supplements. **The Journal of Nutrition**, v.127, n.5, p.869S-873S, 1997.

ARAÚJO, G. C. L.; GONZALES, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.57, n.12, p.2121-2132, 2002.

ARRUDA, M. A. Z. **Trends in sample preparation**. New York: Nova Science Publishers, 2007.

AUGUSTO, A. S.; BARSANELLI, P. L.; PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA FILHO, E. R. Calibration strategies for the direct determination of Ca, K, and Mg in commercial samples of powdered milk and solid dietary supplements using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Food Research International**, v.94, p.72-78, 2017.

AVULA, B.; WANG, YAN-HONG; DUZGOREN-AYDIN, N. S.; KHAN, I. A. Inorganic elemental compositions of commercial multivitamin/mineral dietary supplements: Application of collision/reaction cell inductively coupled-mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v.127, n.1, p.54-62, 2011.

AVULA, B.; WANG, YAN-HONG; SMILLIE, T. J.; DUZGOREN-AYDIN, N. S.; KHAN, I. A. Quantitative Determination of Multiple Elements in Botanicals and Dietary Supplements Using ICP-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.16, p.8887-8894, 2010.

BARIN, J. S. **Desenvolvimento de procedimentos alternativos de preparo de amostras e de determinação de metais pesados em fármacos tricíclicos**. 2007. 115f. Tese. (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F.; MELLO, P. A.; PEREIRA, J. S. F. Microwave-Induced Combustion. In: FLORES, E. M. M. (Ed.). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2014. chapter 5, p.143-177.

BARIN, J. S.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; KNORR, C. L.; MORAES, D. P.; MESKO, M. F.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A.; FLORES, E. M. M. Focused microwave-induced combustion for digestion of botanical samples and metals determination by ICP OES and ICP-MS. **Talanta**, v.94, p.308-314, 2012.

BARNES, R. M.; JÚNIOR, D. S.; KRUG, F. J. Introduction to Sample Preparation for Trace Element Determination. In: FLORES, E. M. M. (Ed.). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2014. chapter 1, p.1-58.

BEAUCHEMIN, D. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.82, n.12, p.4786-4810, 2010.

BHATTACHARYYA, L.; ROHRER, J. S. **Applications of ion chromatography in the analysis of pharmaceutical and biological products**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

BIESEK, S.; ALVES, L. A.; GUERRA, I. **Estratégias de nutrição e suplementação no esporte**. Barueri/SP: Manole, 2015.

BINGS, N. H.; BOGAERTS, A.; BROEKAERT, J. A. C. Atomic Spectroscopy: A Review. **Analytical Chemistry**, v.82, n.12, p. 4653-4681, 2010.

BINNS, C. W.; LEE, M. K.; LEE, A. H. Problems and Prospects: Public Health Regulation of Dietary Supplements. **Annual Review of Public Health**, v.39, n.1, p.403-420, 2018.

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.66, n.5, p.394-398, 2011a.

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MÜLLER, E. I.; SCHMIDT, L.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, v.83, n.5, p.1324-1328, 2011b.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, v.99, n.2, p.193-196, 2011c.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLOTO, R. S.; BARIN, J. S.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods**, v.2, n.6, p.734-738, 2010.

BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S. Diluted Acids in Microwave-Assisted Wet Digestion. In: FLORES, E. M. M. (Ed.). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2014. Chapter 6, p.179-204.

BLAKE, S. **Vitamins and Minerals Demystified**. New York: McGraw-Hill Education, 2007.

BLIESNER, D. M. **Validating chromatographic methods: A Practical Guide**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

BOGDEN, J.; KLEVAY, L. M. **Clinical Nutrition of the Essential Trace Elements and Minerals: The Guide for Health Professionals**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000.

BONN, G.; REIFFENSTUHL, S.; JANDIK, P. Ion chromatography of transition metals on an iminodiacetic acid bonded stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v.499, p.669-676, 1990.

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry**. Norwalk: Perkin Elmer, 1999.

BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T. Axially and radially viewed inductively coupled plasmas – a critical review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.55, n.8, p.1195-1240, 2000.

BU, K.; CIZDZIEL, J. V.; REIDY, L. 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.

CALAND, L. B. D.; SILVEIRA, E. L. C.; TUBINO, M. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations in biodiesel by ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.718, p.116-120, 2012.

CARRO, N. B. Alimentación y nutrición en edad escolar. **Revista Digital Universitaria**, Ciudad de México. v.8, n.4, p.1-7, 2007.

CASTRO, J. T.; SANTOS, W. P. C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v.78, n.4–5, p.1378-1382, 2009.

CHRISTOPHER, S. J.; VETTER, T. W. Application of Microwave-Induced Combustion and Isotope Dilution Strategies for Quantification of Sulfur in Coals via Sector-Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.88, n.9, p.4635-4643, 2016.

CHUANG, I. C.; CHEN, KEH-SHAW; HUANG, YEOU-LIH; LEE, PO-NING; LIN, TE-HSIEN. Determination of trace elements in some natural drugs by atomic absorption spectrometry. **Biological trace element research**, v.76, n.3, p.235-244, 2000.

CORDÁS, T. A.; KACHANI, A. T. **Nutrição em psiquiatria**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 416p.

COSTA, V. C.; PICOLORO, R. S.; HARTWIG, C. A.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.407, n.26, p.7957-7964, 2015.

COWAN, J.; SHAW, M. J.; ACHTERBERG, E. P.; JONES, P.; NESTERENKO, P. N. The ion chromatographic separation of high valence metal cations using a neutral polystyrene resin dynamically modified with dipicolinic acid. **Analyst**, v.125, n.12, p.2157-2159, 2000.

CRIZEL, M. G. **Desenvolvimento de método de decomposição de suplemento esportivo por via úmida sob pressão de O₂ assistido por radiação micro-ondas para a determinação de metais e não metais por técnicas espectrométricas e por cromatografia de íons**. 2015. 112f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

CRUZ, S. M.; TIRK, P.; NORA, F. M. D.; SCHMIDT, L.; WILTSCHE, H.; BIZZI, C. A.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Feasibility of sulfur determination in diesel oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion using flame retardant. **Fuel**, v.160, p.108-113, 2015.

DA SILVA, S. V.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; WAGNER, R.; RICHARDS, N. S. P. S.; BARIN, J. S. Evaluation of bromine and iodine content of milk whey proteins combining digestion by microwave-induced combustion and ICP-MS determination. **Food Chemistry**, v.190, p.364-367, 2016.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008.

DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. **Handbook of mineral elements in food**. Chichester: John Wiley & Sons, 2015.

DISILVESTRO, R. A. **Handbook of Minerals as Nutritional Supplements**. Washington, D.C.: CRC Press, 2004.

DOLAN, S. P.; NORTRUP, D. A.; BOLGER, P. M.; CAPAR, S. G. Analysis of Dietary Supplements for Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.5, p.1307-1312, 2003.

DUYCK, C.; MIEKELEY, N.; SILVEIRA, C. L. P.; SZATMARI, P. Trace element determination in crude oil and its fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry using ultrasonic nebulization of toluene solutions. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.57, n.12, p.1979-1990, fev. 2002.

EHMANN, W. D.; VANCE, D. E. **Radiochemistry and nuclear methods of analysis**. New Jersey: Wiley, 1991.

EITH, C.; KOLB, M.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. **Practical Ion Chromatography**. Herisau: Metrohm Ltd., 2006.

FDA - Food and Drug Administration. **FDA 101: Dietary Supplements**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/dietarysupplements/>>. Acesso em: julho 2018.

FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação: dos primórdios à Idade Média**. Lisboa: Terramar, 1996. 350p

FLORES, E. M. M. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Amsterdam: Elsevier Science, 2014.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels – A brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.62, n.9, p.1051-1064, 2007.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical chemistry**, v.76, n.13, p.3525-3529, 2004.

FLORES, E. M. M.; MÜLLER, E. I.; DUARTE, F. A.; GRINBERG, P.; STURGEON, R. E. Determination of Trace Elements in Fluoropolymers after Microwave-Induced Combustion. **Analytical Chemistry**, v.85, n.1, p.374-380, jan. 2013.

FLORIAN, D.; KNAPP, G. High-temperature, microwave-assisted UV digestion: a promising sample preparation technique for trace element analysis. **Analytical chemistry**, v.73, n.7, p.1515-1520, 2001.

FRITZ, J. S.; GJERDE, D. T. **Ion Chromatography**. 4. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.

GAD, S. C. Cobalt*. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. 2. ed. New York: Elsevier, 2005a. p.631-632.

GAD, S. C. Lithium*. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. 2. ed. New York: Elsevier, 2005b. p.734-735.

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

GOLIMOWSKI, J.; GOLIMOWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v.325, n.3, p.111-133, 1996.

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

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v.79, n.2, p.396-401, 2009.

GOSTON, J. L.; CORREIA, M. I. T. D. Suplementos Nutricionais: Histórico, Classificação, Legislação e Uso em Ambiente Esportivo. **Nutrição e esporte**, v. set/out, p.1-7, 2009.

GRANDJEAN, A. C. Diets of elite athletes: has the discipline of sports nutrition made an impact? **The Journal of nutrition**, v.127, n.5, p.874S-877S, 1997.

GREENBERG, R. R. Pushing the limits of NAA: accuracy, uncertainty and detection limits. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry**, v.278, n.2, p.231-240, 2008.

GREENBERG, R. R.; BODE, P.; DE NADAI FERNANDES, E. A. Neutron activation analysis: A primary method of measurement. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.66, n.3-4, p.193-241, 2011.

HADDAD, P. R.; JACKSON, P. E. **Ion Chromatography: Principles and applications**. Amsterdam: Elsevier Science, 1990.

HARTWIG, C. A.; PEREIRA, R. M.; RONDAN, F. S.; CRUZ, S. M.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. The synergic effect of microwave and ultraviolet radiation for chocolate digestion and further determination of As, Cd, Ni and Pb by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.31, n.2, p.523-530, 2016.

HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G.; CRIZEL, M. G.; MÜLLER, A. L. H.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Determination of bromine and iodine in

shrimp and its parts by ICP-MS after decomposition using microwave-induced combustion. **Analytical Methods**, v.6, n.18, p.7540-7546, 2014.

HATHCOCK, J. Dietary supplements: how they are used and regulated. **The Journal of nutrition**, v.131, n.3, p.1114S-1117S, 2001.

HIGHT, S. C.; ANDERSON D. L.; CUNNINGHAM W. C.; CAPAR, S. G.; LAMONT, W. H.; SINEX, S. A. Analysis of Dietary Supplements for Nutritional, Toxic, and Other Elements. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.6, n.2, p.121-139, 1993.

HOU, X.; JONES, B. T. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. In: MEYERS, R. D. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos** – DOQ-CGCRE-008 Revisão 5 – Agosto/2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf> Acesso em: setembro 2018.

JACKSON, P. E. Ion chromatography in environmental analysis. In: MEYERS, R. D. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

JONES, P.; NESTERENKO, P. N. Use of complexing reagents as additives to the eluent for optimization of separation selectivity in high-performance chelation ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1213, n.1, p.45-49, 2008.

KHAN, I. A.; ALLGOOD, J.; WALKER, L. A.; ABOURASHED, E. A.; SCHILENK, D.; BENSON, W. H. Determination of heavy metals and pesticides in ginseng products. **Journal of AOAC International**, v.84, n.3, p.936-939, 2001.

KHUDER, A.; SAWAN, M. K.; KARJOU, J.; RAZOUK, A. K. Determination of trace elements in Syrian medicinal plants and their infusions by energy dispersive X-ray fluorescence and total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.64, n.7, p.721-725, 2009.

KRAMPITZ, P. D.; BARNES, K. W. The Determination of Minerals in Multivitamin Samples Using Microwave Digestion and ICP-OES Analysis. **Atomic Spectroscopy**, v.19, n.2, p.43-44, 1998.

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

KREJČOVÁ, A.; KAHOUN, D.; ČERNOHORSKÝ, T.; POUZAR, M. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma

optical emission spectrometry with slurry sample introduction. **Food Chemistry**, v.98, n.1, p.171-178, 2006.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016. 572p.

MACIEL, J. V.; KNORR, C. L.; FLORES, E. M. M.; MÜLLER, E. I.; MESKO, M. F.; PRIMEL, E. G.; DUARTE, F. A. Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. **Food Chemistry**, v.145, n.0, p.927-931, 2014.

MARRERO, J.; REBAGLIATI, R. J.; LEIVA, E.; LONDONIO, A.; SMICHOWSKI, P. 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.

MASON, P. **Dietary Supplements**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. 387p.

MAYER, J.; BULLEN, B. Nutrition and athletic performance. **Physiological Reviews**, v.40, n.3, p.369-397, 1960.

MELLO, P. A.; DIEHL, L. O.; OLIVEIRA, J. S. S.; MÜLLER, E. I.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M. Plasma-based determination of inorganic contaminants in waste of electric and electronic equipment after microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.105, p.95-102, 2015.

MELLO, P. A.; PEREIRA, J. S. F.; MORAES, D. P.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Nickel, vanadium and sulfur determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry in crude oil distillation residues after microwave-induced combustion. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.24, n.7, p.911-916, 2009.

MESKO, M. F. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímico e alimentos após combustão iniciada por microondas**. 2008. 156f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MESKO, M. F.; CRIZEL, M. G.; NOVO, D. L. R.; HARTWIG, C. A.; RONDAN, F. S.; BIZZI, C. A. New and feasible method for total phosphorus and sulfur determination in dietary supplements by ion chromatography. **Arabian Journal of Chemistry**, 2018 (In press).

MESKO, M. F.; PICOLOTO, R. S.; FERREIRA, L. R.; COSTA, V. C.; PEREIRA, C. M. P.; COLEPICOLA, P.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further

determination of toxic elements by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.30, n.1, p.260-266, 2015.

MICHALSKI, R. Applications of ion chromatography for the determination of inorganic cations. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.39, n.4, p.230-250, 2009.

MILLER-IHLI, N. J. Solids analysis by GFAAS. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 20, p.964A-968A, 1992.

MONTASER, A. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**. 2. ed. New York, USA: Wiley-VHC, 1998.

MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; MESKO, M. F.; DRESSLER, V. L.; PANIZ, J. N. G.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Evaluation of sample preparation methods for elastomer digestion for further halogens determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.397, n.2, p.563-570, 2010.

MORALES-RUBIO, Á.; DE LA GUARDIA, M. Ion chromatography. In: DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. (Ed.). **Handbook of mineral elements in food**. Chichester: Wiley & Sons, 2015.

NELMS, S. M. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2005. 481p.

NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4. ed. Campinas, Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: agosto 2018.

NOVO, D. L. R.; PEREIRA, R. M.; HARTWIG, C. A.; SANTOS, C. M. M.; MESKO, M. F. A selective volatilization method for determination of chloride and sulfate in calcium carbonate pharmaceutical raw material and commercial tablets. **Talanta**, v.181, p.440-447, 2018.

NOWKA, R.; MARR, I. L.; ANSARI, T. M.; MÜLLER, H. Direct analysis of solid samples by GFAAS – determination of trace heavy metals in barytes. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.364, n.6, p.533-540, 1999.

OLIVEIRA, J. S. S.; PICOLOTO, R. S.; BIZZI, C. A.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted ultraviolet digestion of petroleum coke for the simultaneous determination of nickel, vanadium and sulfur by ICP-OES. **Talanta**, v.144, p.1052-1058, 2015.

PEREIRA, J. S. F.; KNORR, C. L.; PEREIRA, L. S. F.; MORAES, D. P.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Evaluation of sample preparation methods for

polymer digestion and trace elements determination by ICPMS and ICPOES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.26, n.9, p.1849-1857, 2011.

PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; MORAES, D. P.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.64, n.6, p.554 - 558, 2009.

PEREIRA, J. S. F.; MORAES, D. P.; ANTES, F. G.; DIEHL, L. O.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; FONSECA, T. C. O.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion. **Microchemical Journal**, v.96, n.1, p.4-11, 2010.

PEREIRA, J. S. F.; PICOLOTO, R. S.; PEREIRA, L. S. F.; GUIMARÃES, R. C. L.; GUARNIERI, R. A.; FLORES, E. M. M. High-efficiency microwave-assisted digestion combined to in situ ultraviolet radiation for the determination of rare earth elements by ultrasonic nebulization ICPMS in crude oils. **Analytical chemistry**, v.85, n.22, p.11034-11040, 2013.

PEREIRA, J. S. F.; WILTSCHE, H.; KNAPP, G. Microwave-Assisted Ultraviolet Digestion. In: FLORES, E. M. M. (Ed.). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2014. chapter 7. p.205-229.

PEREIRA, L. S. F.; BIZZI, C. A.; SCHMIDT, L.; MESKO, M. F.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Evaluation of nitrates as igniters for microwave-induced combustion: understanding the mechanism of ignition. **RSC Advances**, v.5, n.13, p.9532-9538, 2015a.

PEREIRA, L. S. F.; FROHLICH, A. C.; DUARTE, F. A.; BURROW, R. A.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Determination of halogens and sulfur in pitch from crude oil by plasma-based techniques after microwave-induced combustion. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.30, n.8, p.1822-1827, 2015b.

PEREIRA, L. S. F.; IOP, G. D.; NASCIMENTO, M. S.; DIEHL, L. O.; BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Alternative Igniters Based on Oxidant Salts for Microwave-Induced Combustion Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.27, p.526-533, 2016a.

PEREIRA, L. S. F.; PEDROTTI, M. F.; ENDERS, M. S. P.; ALBERS, C. N.; PEREIRA, J. S. F.; FLORES, E. M. M. Multitechnique Determination of Halogens in Soil after Selective Volatilization Using Microwave-Induced Combustion. **Analytical Chemistry**, v.89, n.1, p.980-987, 2017.

PEREIRA, R. M.; COSTA, V. C.; HARTWIG, C. A.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A.; MESKO, M. F. Feasibility of halogen determination in

noncombustible inorganic matrices by ion chromatography after a novel volatilization method using microwave-induced combustion. **Talanta**, v.147, p.76-81, 2016.

PETRONI, R. **Validação dos métodos de análise por ativação do laboratório de Análise por Ativação Neutronica do IPEN – CNEN/SP visando a produção de materiais de referência certificados**. 2015. 261f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

PICOLOTO, R. S.; DONEDA, M.; FLORES, E. L. M.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; MELLO, P. M. Simultaneous determination of bromine and iodine in milk powder for adult and infant nutrition by plasma based techniques after digestion using microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.107, p.86-92, 2015.

PRAVST, I. Dietary supplement labelling and health claims. In: BERGINC, K.; KREFT, S. (Ed.). **Dietary Supplements**. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. Chapter 1, p.3-24.

PRÖFROCK, D.; PRANGE, A. Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends. **Applied spectroscopy**, v.66, n.8, p.843-868, 2012.

RAMAN, P.; PATINO, L. C.; NAIR, M. G. Evaluation of metal and microbial contamination in botanical supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.52, n.26, p.7822-7827, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n.1, p.164-171, 2008.

SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; WISE, S. A. Dietary supplement standard reference materials. **Life sciences**, v.78, n.18, p.2044-2048, 2006.

SARZANINI, C.; MENTASTI, E. Determination and speciation of metals by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.789, n.1-2, p.301-321, 1997.

SIMOPOULOS, A. P. Opening address. Nutrition and fitness from the first Olympiad in 776 BC to 393 AD and the concept of positive health. **The American journal of clinical nutrition**, v.49, n.5, p.921-926, 1989.

SMALL, H.; STEVENS, T. S.; BAUMAN, W. C. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. **Analytical Chemistry**, v.47, n.11, p.1801-1809, set. 1975.

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

SOŁTYK, K.; ŁOZAKA, A.; OSTAPCZUK, P.; FIJAŁEK, Z. Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.32, n.3, p.425-432, 2003.

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

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

SOUZA, A. R.; CUNHA, S. D. M.; SOUZA, E. H. E.; FREITAS, A. S.; RODRIGUES, V. D. Corpos em evidência: olhares sobre a estética masculina nas academias de ginástica. **Revista digital educación física y deportes**. Buenos Aires. v.19, n.193, 2014.

TOKALIOĞLU, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. **Food Chemistry**, v.134, n.4, p.2504-2508, 2012.

TOKALIOĞLU, Ş.; CLOUGH, R.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**, v.150, p.321-327, 2014.

TOLONEN, M. **Vitamins and Minerals in Health and Nutrition**. Amsterdam: Elsevier Science, 1990.

TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially viewed configuration: an overview of applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, p.678-690, 2007.

TUMIR, H.; BOŠNIR, J.; VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, I.; DRAGUN, Z.; TOMIĆ, S.; PUNTARIĆ, D.; JURAK, G. Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplements on the Croatian market. **Food Control**, v.21, n.6, p.885-889, 2010.

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

WAHEED, S.; RAHMAN, S.; SIDDIQUE, N. Calcium supplements as source of trace elements: Adequacy and safety of supplements with vitamin C, vitamin D and phosphate formulations. **Applied Radiation and Isotopes**, v.89, p.134-140, 2014.

WATSON, R. R. **Foods and dietary supplements in the prevention and treatment of disease in older adults**. New York: Academic Press, 2015.

WEBB, G. P. Vitamins/minerals as dietary supplements: a review of clinical studies. In: BERGINC, K.; KREFT, S. (Ed.). **Dietary Supplements**. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. Chapter 8, p.139-169.

WEISS, J. **Handbook of Ion Chromatography**. 4. ed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2016.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

WHEATLEY, V. M.; SPINK, J. Defining the Public Health Threat of Dietary Supplement Fraud. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, n.6, p.599-613, 2013.

WILDMAN, R. E. C.; WILDMAN, R.; WALLACE, T. C. **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 560p.

WONG, M. K.; TAN, P.; WEE, Y. C. Heavy metals in some Chinese herbal plants. **Biological trace element research**, v.36, n.2, p.135-142, 1993.

WU, P.; HE, S.; LUO, B.; HOU, X. Flame furnace atomic absorption spectrometry: a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.44, n.5, p.411-437, 2009.

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

ZENG, W.; CHEN, Y.; CUI, H.; WU, F.; ZHU, Y.; FRITZ, J. S. Single-column method of ion chromatography for the determination of common cations and some transition metals. **Journal of Chromatography A**, v.1118, n.1, p.68-72, 2006.

ZHOU, X.; MOPPER, K. Determination of photochemically produced hydroxyl radicals in seawater and freshwater. **Marine chemistry**, v.30, p.71-88, 1990.

ANEXOS

ANEXO A – CONCENTRAÇÕES DE MINERAIS DESCRITAS NOS RÓTULOS DOS SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

Tabela 14. Valores informados para Ca, Mg, Mn, Na e Zn pelos fabricantes de alguns dos suplementos dietéticos analisados.

Elementos	Concentração (mg kg ⁻¹)									
	Hipercalóricos					Multivitamínicos/minerais			Botânicos	
	SHP-1	SHP-2	SHP-3	SHP-4	SHP-5	SMVM-1	SMVM-2	SMVM-3	SB-1	SB-2
Ca	n.i.	1512	1094	n.i.	4083	149521	n.i.	167224	8333	8333
Mg	725	395	281	n.i.	650	59809	n.i.	66890	3333	33333
Mn	6,42	3,57	2,50	n.i.	5,83	718	4000	803	333	333
Na	2025	2922	1050	0*	1267	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Zn	19,2	10,9	7,50	n.i.	n.i.	4187	13333	4682	833	833

n.i.: não informado; * 0 mg de Na em 50 g da amostra SHP-4.