

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação de Mestrado

**Avaliação de diferentes métodos de preparo de amostras
biológicas para a determinação de Hg, Cd, Pb e Sn por
Espectrometria de Absorção Atômica**

Eliézer Quadro Oreste

Pelotas, fevereiro de 2013.

Eliézer Quadro Oreste

**Avaliação de diferentes métodos de preparo de amostras
biológicas para a determinação de Hg, Cd, Pb e Sn por
Espectrometria de Absorção Atômica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Química (ênfase em Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira

Pelotas, 2013.

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

O66a Oreste, Eliézer Quadro

Avaliação de diferentes métodos de preparo de amostras biológicas para a determinação de Hg, Cd, Pb e Sn por Espectrometria de Absorção Atômica / Eliézer Quadro Oreste; orientador Anderson Schwingel Ribeiro; co-orientador Mariana Antunes Vieira. - Pelotas, 2013. - 188f.: il. - Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Mercúrio 2.Cádmio 3.Chumbo 4.Estanho 5.Preparo de amostras 6.Amostras biológicas 7.Espectrometria de absorção atômica I. Ribeiro, Anderson Schwingel (orientador) II .Título.

CDD 544.6

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada:

“Avaliação de diferentes métodos de preparo de amostras biológicas para a determinação de Hg, Cd, Pb e Sn por Espectrometria de Absorção Atômica”

Elaborada por:
ELIÉZER QUADRO ORESTE

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro (Orientador - UFPel)

.....
Profa. Dra. Cristiane Luisa Jost (UFSC)

.....
Profa. Dra. Márcia Messias da Silva (UFRGS)

***“Porque todo o que é nascido de Deus
vence o mundo; e esta é a vitória que vence
o mundo, a nossa fé.”***

(1 João 5:4)

Dedico este trabalho:

- *A Deus;*
- *Ao meu pai Hermes e minha Mãe Elis;*
- *A minha irmã Tiállita e meu cunhado Samuel;*
- *A minha namorada Michele.*

Por todo o amor, estímulo e apoio prestado durante esse período.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de todas as coisas, agradeço ao nosso Rei Jesus Cristo, que em todo instante expressa todo o seu amor de forma incondicional àqueles que o buscam de todo o coração.

Ao meu pai Hermes e minha mãe Elis, por estarem sempre ao meu lado e me apoiando em todos os momentos. A minha Irmã Tiállita e meu cunhado Samuel por todo o incentivo a seguir em frente.

A meu grande amor e namorada Michele, por me acompanhar em todos os momentos sempre com muita paciência, atenção, incentivo, dedicação, companheirismo e muito amor. Eu te amo muito meu amor e muito obrigado por tudo, és muito importante para a minha vida!

Aos meus sogros, Paulo e Angela, e meu cunhado, Pablo, por participarem e contribuírem durante esse período.

Aos meus padrinhos, Regina e Wilson, por participarem de todos os momentos e sempre me dando a maior força possível.

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson S. Ribeiro, pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos feitos para o meu crescimento profissional, amizade e confiança prestada durante este período. A minha co-orientadora Profa. Dra. Mariana A. Vieira, por todas as contribuições dadas a este trabalho, ajuda e confiança depositada.

Ao meu colega de laboratório e Iniciação Científica, Richard, por toda a ajuda prestada durante a realização de todo o trabalho, principalmente por estar sempre ao meu lado nos momentos de “batalhas” para conseguir obter os resultados.

A todos os colegas do Laboratório de Metrologia Química, Camila Oliz, Eliete, Marcelo, Meibel, Alexander, Camila Corrêa, Carol, Eliane, Helen, Marta, Rodrigo, Ana Clara, Mariana e Paulo, por todos os momentos de alegria e aprendizagem vividos. Agradeço também a Profa. Dra. Adriane e a Profa. Dra.

Emilene, por toda a ajuda prestada.

A todos os professores do curso de mestrado, os quais contribuíram para minha formação.

A todos os meus colegas de mestrado, por todos os momentos vividos durante esse período

Aos amigos da IEQ, pelo companheirismo e orações compartilhadas.

Meus sinceros agradecimentos aos membros da banca avaliadora, Profa. Dra. Márcia Messias da Silva e Profa. Dra. Cristiane Luisa Jost, por sua disposição em estarem contribuindo com este trabalho.

Agradeço ao CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

RESUMO

Título: Avaliação de diferentes métodos de preparo de amostras biológicas para a determinação de Hg, Cd, Pb e Sn por Espectrometria de Absorção Atômica

Autor: Eliézer Quadro Oreste

Orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira

Este trabalho está dividido em dois distintos capítulos, as quais representam trabalhos executados separadamente, mas que tem como principal objetivo o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras biológicas. No primeiro capítulo, foram realizados estudos para a determinação de Hg em materiais de referência certificados (CRM's) de peixe pela técnica de espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS), uma vez que o controle desse elemento é muito importante devido ao seu alto nível de toxicidade. Essas amostras foram tratadas por meio de uma decomposição ácida em bloco digestor com adaptação de um sistema de dedo frio aos tubos digestores. O sistema de dedo frio desenvolvido conta com uma circulação de água fria no interior do dedo, o que minimiza possíveis perdas de analito e/ou ácido por volatilização durante o processo de aquecimento. Para a determinação de Hg total, estudos de temperatura do bloco digestor foram realizados com solução padrão aquosa (Hg^{2+} , CH_3Hg^+ ou $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) em um intervalo de 80 a 160 °C. Nessas temperaturas, o sistema de dedo frio apresentou eficiência por não registrar perdas significativas do analito quando comparado com o sistema convencional aberto. O procedimento de preparo dos CRM's consistiu no emprego de apenas HNO_3 (conc.) como meio oxidante por um período de 2 horas de aquecimento em temperaturas de 90, 120 e 150 °C utilizando o sistema proposto e o convencional aberto. Observou-se que o sistema de dedo frio apresentou resultados satisfatórios, enquanto o sistema convencional registrou perdas significativas de analito. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) alcançados pela metodologia desenvolvida foram de 0,014 e 0,044 mg Kg⁻¹, respectivamente. O sistema de dedo frio apresentou-se como uma ótima alternativa para o processo de decomposição ácida, pois a ele podem ser atribuídas características como simplicidade, segurança e baixo

custo.

O segundo capítulo apresenta um estudo para a determinação de Cd, Pb e Sn em amostras de carnes (reais e CRM's) por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Para isso, três diferentes métodos de preparo de amostra foram empregados, como a digestão ácida com HNO₃ (conc.), solubilização com ácido fórmico (HCOOH) ou hidróxido de tetrametilamônio (TMAH). O processo de decomposição ácida foi realizado em bloco digestor com sistema de dedo frio, com o qual foi possível tratar as amostras em altas temperaturas do bloco digestor, sem registrar perdas significativas de analito e ácido, por um curto período de tempo (uma hora). Já os processos de solubilização, tanto ácida como alcalina, foram realizados a temperatura ambiente e as amostras deixadas em repouso até atingir uma solubilização completa. Para a determinação dos respectivos analitos, o programa de temperatura do forno de grafite foi otimizado para cada elemento nos três diferentes meios de tratamento das amostras, além do emprego de uma mistura entre Pd e Mg como modificador químico. As figuras de mérito registradas foram levemente melhores para o método que emprega a decomposição ácida, o qual registrou LDs de 0,0006, 0,0164 e 0,0520 mg Kg⁻¹ para Cd, Pb e Sn, respectivamente. A metodologia foi validada com testes de adição e recuperação de analito nas amostras reais, obtendo resultados na faixa de 93,7 a 109 % de recuperação. Além disso, CRM's foram analisados após o tratamento com todos os procedimentos apresentados para a determinação dos analitos, com os quais foi possível obter resultados satisfatórios. Os melhores resultados foram obtidos pelo procedimento de digestão ácida com o sistema de dedo frio, que, além disso, mostrou-se rápido e sem risco de contaminações.

Palavras-chave: *Mercúrio, Cádmio, Chumbo, Estanho, Preparo de Amostras, Amostras biológicas, Espectrometria de absorção atômica.*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado em Química

Pelotas, Fevereiro de 2013.

ABSTRACT

Title: *Avaliation of different methods to prepare biological samples for determination of Hg, Cd, Pb and Sn by atomic absorption spectroscopy.*

Author: Eliézer Quadro Oreste

Mastermind: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Co-mastermind: Prof. Dr. Mariana Antunes Vieira

This work is divided in two different chapters which represent two different essays that were developed separately, though they have a common objective, which is the developing of sample preparation methods for biological samples. On the first chapter, a study was done to determine the mercury (Hg) in certified reference materials (CRM's) of fish by the *cold vapor atomic absorption spectrometry* technique (CV AAS) was accomplished, since the control of this element is very important due to their high level of toxicity. Those samples were treated by an acid decomposition in a digester block with an adaptation of cold finger to the tubes digesters. The system of cold finger developed account with a circulation of cold water in the inside of the finger, which minimizes possible losses of analyte and/or acid through volatilization during a heating process. To determine the total of Hg, studies of the digester block's temperature were accomplished with a standard aqueous solution (Hg^{2+} , CH_3Hg^+ or $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) in an interval from 80 to 160 °C. In those temperatures, the cold finger system presented efficiency because it did not registered significant losses of analyte when compared to an open conventional system. The preparation procedure of CRM's consisted in using only HNO_3 as the oxidizing environment through a 2 hours heating process in temperatures of 90, 120 and 150 °C using the proposed system and the open conventional. Was possible to check that the cold finger system presented satisfactory results, while the conventional system was registered significant losses of analyte. The limit detection (LD) and the limit of quantification (LQ) achieved by the methodology developed was of 0,014 and 0,044 mg Kg^{-1} , respectively. The cold finger system presented as a great alternative to the acid decomposition process because it can be attributed characteristics as simplicity, security and low cost.

The second chapter presents a study for determination of Cd, Pb and Sn

in meat samples (real and CRM's) by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). For that, three different methods of preparing the samples were applied, as the acid digestion with HNO_3 , solubilization with formic acid (HCOOH) or tetramethylammonium hydroxide (TMAH). The process of acid decomposition was performed in a digester block with a cold finger system, which made possible to treat the samples in high temperature of the digester block, without registering significant losses of analyte and acid, for a short period of time (one hour). Already the processes of alkaline or acidic solubilization were done in ambient temperature and left to rest until they obtained a complete solubilization. To determine the respective analytes, the graphite furnace's temperature program was optimized for each element in the three different means of the sample treatment, in addition of the use of a mixture of Pd and Mg as a chemical modifier. The figures of merit recorded were slightly better for the method that employs the acid decomposition, which registered LDs of 0,0006, 0,0164 and 0,0520 mg Kg^{-1} for the Cd, Pb and Sn respectively. The methodology was validated with tests of addition and recovery of analyte in the real samples, obtaining results in a range from 93.7 to 109 % recovery. Besides that, CRM's were analyzed after the treatment with all the procedures presented for the determination of the analyte, which made possible to obtain satisfactory results. The best results were obtained by the acid digestion procedure with the cold finger system, that besides that, showed to be quick and with no contamination risk.

Keywords: mercury, cadmium, lead, tin, preparation of samples, biological samples, atomic absorption spectroscopy.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
POST GRADUATION PROGRAM IN CHEMISTRY
Dissertation for Master's degree in Chemistry
Pelotas, February, 2013.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo global do Hg	08
Figura 2 - Exposição humana ao Hg a partir do ambiente contaminado ..	09
Figura 3 - Proporção global de emissões antropogênicas de Hg para atmosfera no ano de 2005	10
Figura 4 – Concentração biológica de Hg no meio ambiente	12
Figura 5 – Vias metabólicas com destaque para a degradação da glicose para posterior oxidação da Acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico	15
Figura 6 - Agentes quelantes utilizados para o tratamento de intoxicação por Hg	17
Figura 7 - Faixa de limite de detecção para alguns métodos óticos de análise	21
Figura 8 - Processo de absorção atômica	24
Figura 9 - Componentes básicos de um espectrômetro de absorção atômica	25
Figura 10 - Esquemas de sistema de fluxo contínuo (A) e injeção em fluxo (B) para geração química de vapor	28
Figura 11 - Esquema de sistema em batelada para CVG	29
Figura 12 - Esquema do mecanismo de geração de hidretos utilizando NaBH ₄	31
Figura 13 - Indicação de elementos da tabela periódica aptos a VG, onde os azuis indicam a HG AAS e em amarelo a CV AAS	33
Figura 14 - Diferentes opções que podem ser adotadas para a etapa de preparo de amostras	36
Figura 15 - Desenho esquemático de (A) dedo frio, (B) tubo de digestão e (C) sistema de digestão com dedo frio	46
Figura 16 - Esquema do sistema de geração de vapor frio (CV AAS) utilizado para a determinação de Hg	49

Figura 17 - Sistema de dedo frio utilizado no processo de decomposição ácida. (A) Diagrama esquemático e (B) Figura ilustrativa	50
Figura 18 - Sistema de dedo frio utilizado para verificação da temperatura da (A) solução ácida da amostras e da (B) parede do frasco de decomposição	51
Figura 19 - Processo de decomposição ácida utilizando sistema com dedo frio	53
Figura 20 - Efeito da temperatura no processo de decomposição de soluções contendo padrões de (A) Hg^{2+} , (B) CH_3Hg^+ e (C) $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ a uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Tais digestões foram realizadas em (-○-) sistema convencional aberto e em (-□-) sistema contendo dedo frio ...	54
Figura 21 - Temperatura atingida ao longo do tempo para o processo de decomposição da amostra TORT-2 utilizando HNO_3 como oxidante e uma temperatura de 150°C selecionada no bloco digestor. Temperatura observada para a solução da amostra (-■-) e para a parede do tudo digestor (-●-)	56
Figura 22 - Consumo alimentar médio <i>per capita</i> (em g/dia) da população brasileira no período de 2008 a 2009	68
Figura 23 - Consumo anual <i>per capita</i> (em Kg) para os países do mundo no ano de 2007	70
Figura 24 - Evolução anual da balança comercial brasileira e do agronegócio – 1989 a 2011 – (em US\$ bilhões)	71
Figura 25 - Rebanhos brasileiros para diferentes espécies de animais ...	72
Figura 26 - Classificação dos elementos da tabela periódica	75
Figura 27 - Principais fontes de contaminação de alimentos em geral	77
Figura 28 - Formas endógenas de contaminação da carne bovina	79
Figura 29 - Consumo setorial brasileiro de Sn	82
Figura 30 - Principais fontes de uso de Cd mundialmente	85
Figura 31 - Estatística da produção e uso de Pb mundialmente	89

Figura 32 - Forno de grafite desenvolvido por L'Vov: (A) tubo de grafite esquemático e (B) Câmara com atomizador	94
Figura 33 - Esquema de um forno de grafite	95
Figura 34 - Programa de temperatura de uma análise química por GF AAS	97
Figura 35 – Amostras biológicas tratadas por diferentes procedimentos. Decomposição ácida (A), solubilização com HCOOH (B) e solubilização com TMAH (C)	113
Figura 36 - Curvas de pirólise (sólido) e atomização (aberto) para $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd na presença de HNO_3 (A), HCOOH (B) e TMAH (C). Solução aquosa (-□-)(-■-) e da amostra (-○-)(-●-) sem a adição de modificador químico e solução aquosa (-△-)(-▲-) e da amostra (-◇-)(-◆-) com a adição de $3 \mu\text{g}$ de Mg + $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico	116
Figura 37 - Curvas de pirólise (sólido) e atomização (aberto) para $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb na presença de HNO_3 (A), HCOOH (B) e TMAH (C). Solução aquosa (-□-)(-■-) e da amostra (-○-)(-●-) sem a adição de modificador químico e solução aquosa (-△-)(-▲-) e da amostra (-◇-)(-◆-) com a adição de $3 \mu\text{g}$ de Mg + $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico	119
Figura 38 - Curvas de pirólise (sólido) e atomização (aberto) para $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sn na presença de HNO_3 (A), HCOOH (B) e TMAH (C). Solução aquosa (-□-)(-■-) e da amostra (-○-)(-●-) sem a adição de modificador químico e solução aquosa (-△-)(-▲-) e da amostra (-◇-)(-◆-) com a adição de $3 \mu\text{g}$ de Mg + $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico	121
Figura 39 - Efeito da temperatura de mineralização de amostra biológica (carne bovina enlatada), em meio de HNO_3 e utilizando o sistema de dedo frio, para a determinação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd (-□-), $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb (-○-) e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sn (-△-)	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Importantes propriedades Físico-Químicas do Hg	06
Tabela 2 - Ponto de ebulição de alguns ácidos à pressão atmosférica.....	39
Tabela 3 - Condições operacionais do AAS	48
Tabela 4 - Resultados analíticos para a determinação de Hg total por CV AAS em CRMs após decomposição ácida em sistemas abertos convencional e com uso do dedo frio, ($n=3$)	59
Tabela 5 - Exportação brasileira de carnes no ano de 2011	73
Tabela 6 – Limites de referência para contaminantes inorgânicos em carnes	80
Tabela 7 - Importantes propriedades físico-químicas do Sn	81
Tabela 8 - Importantes propriedades físico-químicas do Cd	84
Tabela 9 - Importantes propriedades físico-químicas do Pb	88
Tabela 10 - Condições ideais de GF AAS para atender às condições STPF	96
Tabela 11 - Parâmetros operacionais para a determinação de Cd, Pb e Sn	109
Tabela 12 - Programa de temperatura e tempo utilizada para a determinação de Cd em amostras biológicas	118
Tabela 13 - Programa de temperatura e tempo utilizada para a determinação de Pb em amostras biológicas	120
Tabela 14 - Programa de temperatura e tempo utilizada para a determinação de Sn em amostras biológicas	122
Tabela 15 - Parâmetros de mérito para a determinação de Cd, Pb e Sn em diferentes meios	124

Tabela 16 - Resultados analíticos para Sn em amostras reais de carne após diferentes procedimentos de preparo e determinadas por GF AAS, ($n = 3$)	128
Tabela 16 - Teste de adição e recuperação para Cd, Pb e Sn em amostras de carnes tratadas em diferentes meios de preparo, ($n = 3$)	129
Tabela 17 - Percentual de recuperação do teste de adição de analito	130
Tabela 18 - Resultados analíticos obtidos para Cd, Pb e Sn em CRMs tratadas por diferentes procedimentos e determinadas por GF AAS, ($n=3$)	130

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês Atomic Absorption Spectrometry
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
ATSDR	Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Controle de Doenças, do inglês Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CF	Fluxo Contínuo, do inglês Continuous Flow
CRM	Material de Referência Certificada, do Inglês Certified Reference Materials
CV AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio, do inglês Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry
CV AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica com Vapor Frio, do inglês Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry
CVG AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração Química de Vapor, do inglês Chemical Vapor Generation Atomic Absorption Spectrometry
E	Energia
E₁	Componente Piruvato Desidrogenase
E₂	Di-Hidrolipoil Transacetilase
E₃	Di-Hidrolipoil Desidrogenase
EEB	Encefalopatia Espongiforme Bovina
EPA	Agência de Proteção Ambiental, do inglês Environmental Protection Agency.

F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations
FI	Injeção em Fluxo, do inglês Flow Injection
FSA	Agência de Padrões Alimentares, do inglês Food Standards Agency
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
GLS	Separador Gás/Líquido, do inglês Gas Liquid Separator
HCOOH	Ácido Fórmico
HG AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos, do inglês Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP OES	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
ILA	Associação Internacional de Chumbo, do inglês International Lead Association
ILZSG	Grupo Internacional de Estudos de Chumbo e Zinco, do inglês International Lead and Zinc Study Group
IMC	Índice de Massa Corporal
IMO	Organização Marítima Internacional, do inglês International Maritime Organization
LD₅₀	Dose letal capaz de matar 50 % dos indivíduos de uma população em teste

LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MIC	Combustão Iniciada por Micro-Ondas, do inglês Microwave Induced Combustion
MME	Ministério de Minas e Energia
MS	Ministério da Saúde
photo-CV AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração Fotoquímica de Vapor, do inglês Photochemical Vapor Generation Coupled with Atomic Absorption Spectrometry
PIB	Produto Interno Bruto
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoretileno
QTA	Atomizador de Tubo de Quartzo, do inglês Quartz Tube Atomizer
RSD	Desvio Padrão Relativo, do Inglês Relative Standard Deviation
S	Sensibilidade
sd	Desvio Padrão
SNC	Sistema Nervoso Central
SS GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite com Amostragem de Sólidos, do inglês Solid Sample Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
STPF	Forno Plataforma com Temperatura Estabilizada, do inglês Stabilized Temperature Platform Furnace
SVB	Sociedade Vegetariana Brasileira

TGI	Trato Gastrointestinal
TMAH	Hidróxido de Tetrametilamônio, do inglês Tetramethylammonium Hydroxide
UE	União Europeia
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas, do inglês United Nations Environment Programme
UV	Radiação Ultravioleta
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês World Health Organization
ν	Frequência
λ	Comprimento de Onda
h	Constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J S)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS	XVIII

CAPÍTULO 1

Determinação de Hg Total em Amostras Biológicas por CV AAS após Digestão Ácida com Sistema de Refluxo.

1. Introdução	02
1.1. Apresentação do Problema	02
2. Objetivos	05
2.1. Objetivos gerais	05
2.2. Objetivos específicos	05
3. Revisão da literatura	06
3.1. Mercúrio: aspectos gerais	06
3.1.1. Poluente ambiental	07
3.1.2. Toxicidade do mercúrio	11
3.1.3. Mercúrio em amostras biológicas	17
3.2. Determinação de mercúrio	19
3.2.1. Métodos óticos de análise para a determinação de Hg	20
3.2.2. Espectrometria de absorção atômica (AAS)	23
3.2.3. Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor	26

3.2.3.1. Geração de vapor frio (CV AAS)	33
3.3. Preparo de amostras	35
3.3.1. Métodos para o preparo de amostras biológicas	37
3.3.1.1. Decomposição de amostras biológicas	38
3.3.1.2. Uso de dedo frio no preparo de amostras	43
4. Materiais e Métodos	48
4.1. Instrumentação	48
4.2. Reagentes e Amostras	51
4.3. Preparo de amostras e soluções de calibração	52
5. Resultados e Discussão	54
5.1. Efeito da temperatura de preparo de amostra	54
5.2. Parâmetros de mérito	58
5.3. Determinação de Hg total em amostras biológicas	58
6. Considerações Finais	61

CAPÍTULO 2

Emprego de diferentes métodos para o preparo de amostras e determinação de Cd, Pb e Sn em carnes por GF AAS.

1. Introdução	63
2. Objetivos	66
2.1. Objetivos gerais	66
2.2. Objetivos específicos	66
3. Revisão da literatura	67
3.1. Produtos alimentícios cárneos: consumo no Brasil e no mundo	67
3.2. Exportação e Importação	71
3.3. Controle de metais em carnes	74
3.3.1. Contaminação com metais tóxicos	76

3.3.2. Contaminação por Sn	80
3.3.3. Contaminação por Cd	84
3.3.4. Contaminação por Pb	88
3.4. Técnicas de análise para determinação de Cd, Pb e Sn	91
3.4.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite .	93
3.4.2. Uso de modificadores químicos	99
3.5. Avaliação de métodos de preparo de amostras	102
3.5.1. Solubilização alcalina com TMAH	103
3.5.2. Solubilização ácida com HCOOH	106
3.5.3. Decomposição ácida	108
4. Materiais e Métodos	109
4.1. Instrumentação	109
4.2. Reagentes e materiais	110
4.3. Amostras e procedimentos de preparo	111
4.3.1. Procedimento 1: Mineralização com sistema de dedo frio.....	112
4.3.2. Procedimento 2: Solubilização com HCOOH	112
4.3.3. Procedimento 3: Solubilização com TMAH	113
4.4. Metodologia	113
5. Resultados e Discussão	115
5.1. Otimização do programa de temperatura e tempo do GF AAS ..	115
5.1.1. Otimização do programa para a determinação de Cd	115
5.1.2. Otimização do programa para a determinação de Pb	118
5.1.3. Otimização do programa para a determinação de Sn	120
5.2. Parâmetros de mérito	123

5.3. Efeito da temperatura de decomposição ácida das amostras.....	125
5.4. Resultados analíticos para a determinação de Cd, Pb e Sn em amostras biológicas de carne	127
6. Considerações Finais	133
7. Referências bibliográficas gerais	134

CAPÍTULO 1

***Determinação de Hg Total em Amostras Biológicas por CV AAS
após Digestão Ácida com Sistema de Refluxo***

1. Introdução

1.1. Apresentação do Problema

O Hg é um elemento que se encontra presente no meio ambiente, seja por meio de emissões de forma natural ou por ações antropogênicas. Sendo assim, o ser humano pode ser levado a uma exposição direta a esse elemento extremamente tóxico, que mesmo em concentrações baixas pode causar efeitos deletérios à saúde. Além disso, outra forma de exposição humana é através da ingestão de alimentos contaminados, principalmente de origem marinha, visto que uma vez contaminado o meio aquático, os peixes tendem a absorverem esse metal e acumular o mesmo em seus tecidos, principalmente na forma de metilmercúrio [1-3].

No meio ambiental, o Hg pode ser encontrado na forma inorgânica ou orgânica, as quais diferem grandemente em suas propriedades bio-físico-químicas tais como toxicidade, solubilidade e taxa de bioacumulação pelos organismos. Na sua forma inorgânica, esse elemento pode ser encontrado sob a forma elementar (Hg^0), de íon mercurioso (Hg_2^{2+}) e de íon mercúrico (Hg^{2+}). Já na sua forma orgânica, o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, como o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), os quais são os mais comuns. Contudo, esses compostos de Hg podem causar efeitos nocivos nos sistemas nervoso, reprodutivo, digestivo, renal, cardíaco, imunológico, entre outros, tanto em situações de exposição aguda quanto crônica [3, 4].

Devido à grande toxicidade de Hg, fica evidente a necessidade de métodos que viabilizem a determinação desse metal e suas espécies (análise de especiação), a fim de avaliar o real impacto no meio ambiente, principalmente para os sistemas aquáticos, a vegetação e aos seres humanos. Contudo, em alguns casos a concentração presente de Hg é muito baixa, necessitando assim métodos sensíveis e precisos para a quantificação desse elemento, a fim de garantir um monitoramento adequado para apontar os possíveis riscos associados com as amostras em análise. Além disso, é desejável que esses métodos sejam simples, baratos e rápidos para a análise nos mais variados tipos de amostras [3, 5].

Em relação às técnicas disponíveis para a determinação de Hg, a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) é uma das mais utilizadas, pois trata-se de uma técnica simples onde o próprio vapor formado pela reação do Hg com um reagente redutor já é vapor atômico e então, pode ser conduzido até uma cela de absorção, situada no caminho ótico do espectrômetro [6, 7]. Essa técnica de CV AAS recentemente vem sendo também muito explorada com o uso de radiação ultravioleta (UV) para a redução de Hg, ao invés de se utilizar reagentes redutores frequentemente empregados na técnica convencional (SnCl_2 ou NaBH_4). Esta técnica, conhecida como geração fotoquímica de vapor (*photo*-CV AAS), é caracterizada por também ser de simples manuseio, além de promover a química verde por utilizar menor quantidade de reagente, geralmente apenas um meio orgânico de baixo peso molecular, para a reação de redução [7, 8].

Outras técnicas de detecção também ganham destaque na literatura e tem sido frequentemente empregadas para a determinação deste elemento nos mais diversos tipos de amostras, como a espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [9, 10]. Contudo, devido a grande parcela da espécie orgânica de Hg presente nas amostras, principalmente de origem biológica [11], a determinação de Hg total pode tornar-se inviável quando se faz o uso da técnica de CV AAS, pois espécies organomercuriais não são reduzidas a sua forma elementar (Hg^0) com SnCl_2 ou não totalmente com NaBH_4 [12].

Para contornar tais inconvenientes na determinação de Hg total, as atenções se voltam para a etapa de preparo das amostras, as quais devem sofrer um tratamento adequado para garantir resultados seguros. Sendo assim, uma possibilidade é a oxidação da matéria orgânica presente na amostra, a fim de liberar o Hg da matriz e convertendo-o a sua forma de íon mercúrico. Para isso, uma variedade de ácidos fortes e oxidantes poderosos podem ser usados, individualmente ou por meio de uma mistura desses reagentes, aliados a um sistema de aquecimento, promovendo assim um meio oxidativo a fim de garantir uma eliminação efetiva da matéria orgânica [12-14]. Contudo, a utilização de tal procedimento em um sistema aberto torna-se totalmente

inviável, pois trata-se de um elemento extremamente volátil e, como é necessário a utilização de temperaturas relativamente elevadas para tais procedimentos, pode levar a erros durante essa etapa e refletir assim em resultados inexatos [14-15].

Uma alternativa para a digestão de amostras para a determinação de elementos voláteis é a utilização de um sistema fechado, principalmente assistida por micro-ondas, pois assim o risco de perdas dos analitos por volatilização e de contaminação é minimizado [14-16]. Além disso, outros meios como o uso de solubilização alcalina com TMAH [12, 17, 18] ou ácida com HCOOH [19, 20] também vem ganhando destaque na literatura para a determinação de Hg em amostras biológicas. Contudo, o uso de digestão ácida é muitas vezes necessário para a determinação de Hg total, pois quando realizado de forma segura, é possível converter todas as espécies organomercuriais para a forma inorgânica, sendo esta apta para ser quantificada pela técnica de CV AAS [21]. Sendo assim, torna-se atrativo o desenvolvimento de sistemas alternativos convencionais para o tratamento das amostras, os quais visem a simplicidade de operação, eficiência, segurança e com baixo custo.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral propor um método de preparo de amostras para a determinação de Hg total em amostras biológicas por CV AAS.

2.2. Objetivos Específicos

- Apresentar um novo sistema de dedo frio (refluxo), o qual é acoplado aos tubos convencionais de digestão;
- Apresentar estudos para avaliar a eficiência do sistema de refluxo na etapa de preparo das amostras;
- Salientar as vantagens e desvantagens do sistema proposto com os demais métodos convencionalmente utilizado;
- Discutir os resultados obtidos para o processo de digestão;
- Avaliar se a metodologia desenvolvida pode então ser empregada para o controle de Hg em amostras reais.

3. Revisão da Literatura

3.1. Mercúrio: aspectos gerais

O Hg na sua forma elementar é um líquido denso e prateado nas condições normais de pressão e temperatura. Além dessa propriedade, o Hg possui outras como a sua alta gravidade específica, condutividade elétrica e facilidade de resfriamento, o que levou a várias aplicações desse metal em diversos campos da indústria [22]. A Tabela 1 mostra algumas das propriedades do Hg de uma forma geral, pois dependendo do composto em que esse elemento se encontra, algumas dessas propriedades podem ser diferenciadas [22, 23].

Tabela 1 – Importantes propriedades Físico-Químicas do Hg. Adaptado de Ebadian e colaboradores [22].

Propriedades	Valor
Número atômico	80
Massa atômica	200,59 g mol ⁻¹
Densidade	13,55 g cm ⁻³ a 20 °C
Temperatura de fusão	-38,87 °C
Temperatura de ebulição	357,73 °C
Pressão de vapor	1,6 bar a 20 °C
Condutividade térmica	8,34 W m ⁻¹ K ⁻¹
1º potencial de ionização	10,4375 eV
2º potencial de ionização	18,7510 eV
Resistividade	95,75 μΩ cm a 20 °C
Tensão superficial	436 dines cm ⁻¹ a 25 °C
Viscosidade	1,55 Pa s a 20 °C
Solubilidade	60-80 μg L ⁻¹ a 20 °C (em H ₂ O)

Com relação aos compostos formados a partir desse metal, são mais abundantes aqueles ligados ao Hg(II) do que quando comparado com os compostos formados com Hg(I). Dentre os mais encontrados, destaca-se o

cloreto de mercúrio (HgCl_2), o cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2), fulminato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{CNO})_2$) e sulfeto de mercúrio (HgS). Além desses compostos, também é destacável a formação de organomercuriais, nos quais o Hg é ligado a pelo menos um átomo de carbono, formando assim compostos com a ligação Hg-C quimicamente estável, que não se rompe em meio aquoso de ácidos e bases fracos [4, 22].

O uso de Hg para algum fim industrial, principalmente em países de alta renda, vem sendo reduzido ou substituído em produtos e processos regulamentados, como por exemplo na produção de tintas, baterias e pesticidas. Contudo, em países de baixa renda, o uso desse metal ainda continua evidente na produção do monômero cloreto de vinila e em minerações artesanais de ouro. Isso contribui consideravelmente em emissões desse elemento para a atmosfera, podendo levar a impactos negativos e preocupantes à saúde humana e ao meio ambiente [24].

3.1.1. Poluente ambiental

O Hg é considerado um poluente atmosférico perigoso segundo a EPA (*Environmental Protection Agency*) dos EUA e merece extrema atenção devido a sua toxicidade. Contudo, várias fontes de emissão de Hg contribuem para a poluição ambiental, as quais podem ser classificadas em emissões naturais ou antropogênicas. Como fonte natural, pode-se destacar a emissão desse elemento através da desgaseificação da crosta terrestre, de vulcões ou por meio de evaporação dos oceanos. Já como fonte antropogênica, as principais formas são a partir do processo de mineração de ouro ou pela queima de combustíveis fósseis para energia [1, 24]. Uma vez lançado para a atmosfera, o Hg pode se dispersar por quilômetros e resistir por um grande tempo, o que está ligado diretamente à forma físico-química em que este elemento se encontra [25]. A Figura 1 mostra o ciclo global para esse elemento, onde o Hg lançado para a atmosfera pode ser transportado pelo ar e se depositar no solo e em rios, sofrendo sucessivas transformações químicas, seja no meio aéreo como no meio aquático.

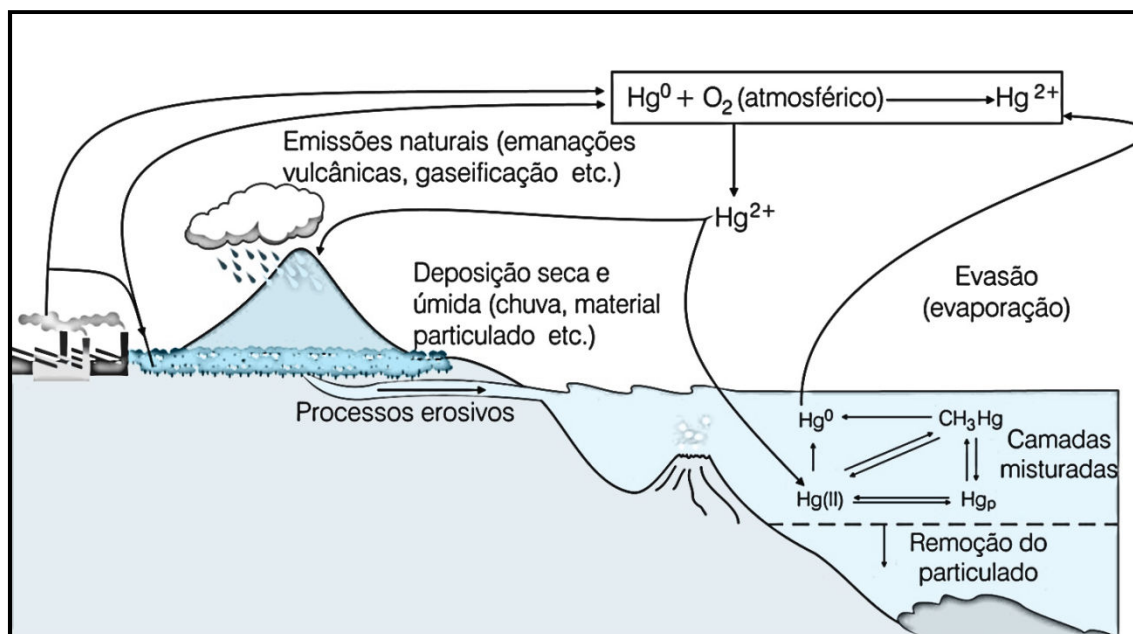
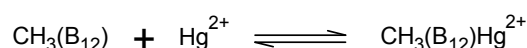
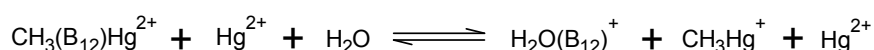


Figura 1 – Ciclo global do Hg. Adaptado de Souza e colaboradores [26].

Conforme pode ser verificado a partir da Figura 1, o Hg quando depositado no ambiente aquático tem a capacidade de ser convertido a sua forma orgânica (geralmente metilmercúrio) por meio de uma reação. Essa reação pode ocorrer sob condições aeróbias e anaeróbias, através de um mecanismo biológico ou químico. Contudo, para o caso demonstrado na Figura 1, o mecanismo mais provável é o biológico, no qual o Hg é metilado através de uma reação que ocorre principalmente com metilcobalamina, coenzima da vitamina B₁₂, que encontra-se em quantidades significativas nesse meio, uma vez que esta pode ser produzida por bactérias. A Equação 1 mostra tais reações do Hg com a metilcobalamina em meio aquoso [27, 28].



Eq. 1 (A e B)*



Uma vez no ambiente, o Hg pode chegar facilmente aos seres humanos, seja por consumo de alimentos contaminados, principalmente alimentos de origem marinha, ou através da exposição dérmica ao ar, água ou solos. Com

* Adaptado de Craig e Morton. [28]

relação à exposição a forma orgânica de Hg, a situação pode tornar-se crítica, visto que nessa forma o metal tem a propriedade de bioacumular-se e sendo eliminado de uma forma muito mais lenta do que quando comparado com a forma inorgânica desse elemento [27, 29]. A Figura 2 mostra um esquema de exposição humana ao ambiente contendo Hg.

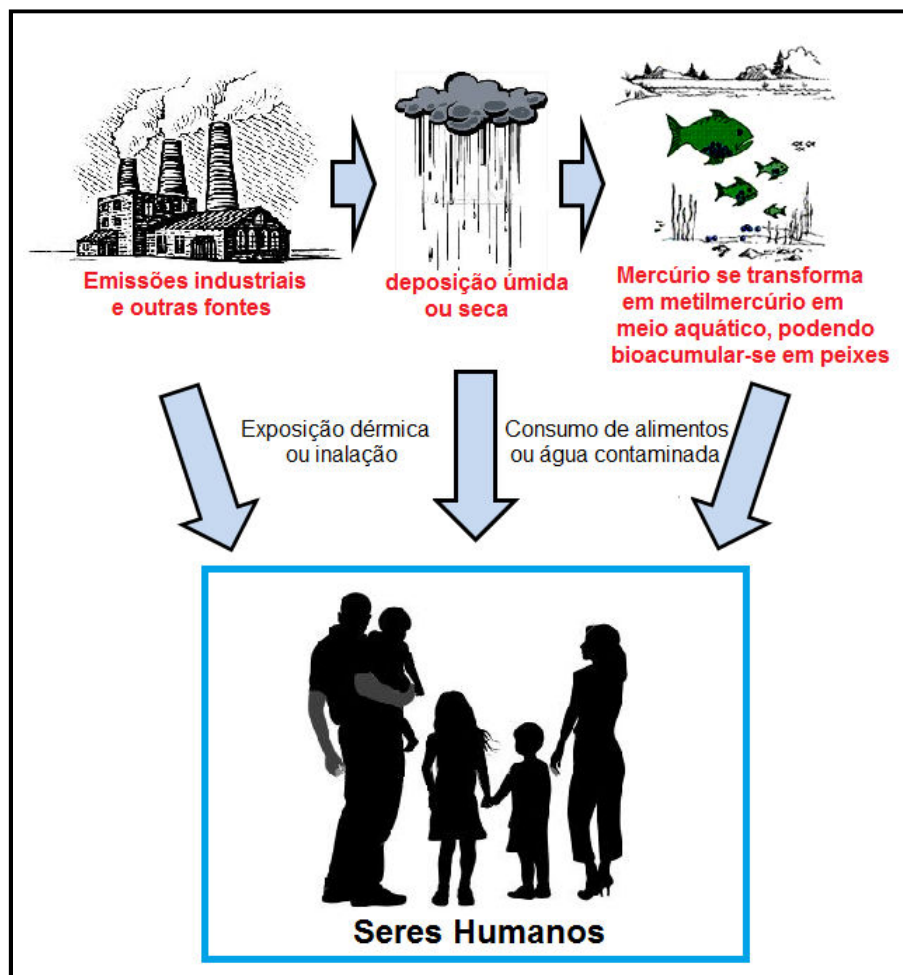


Figura 2 – Exposição humana ao Hg a partir do ambiente contaminado. Adaptado de UNEP [29].

Apesar desse elemento ser um grande problema ambiental, ainda há grandes índices de emissões para a atmosfera, o que vem preocupando a comunidade, que vem buscando projeções futuras a fim de reduzir tais emissões [24]. Em um relatório publicado recentemente pela UNEP (*United Nations Environment Programme*) [30], um levantamento dos dados de emissões para Hg foi realizado para o ano de 2005, na qual constatou-se um valor de 1921 toneladas, com uma incerteza que varia de 1221 à 2950

toneladas, desse metal lançado para a atmosfera de forma antropogênica, onde o maior responsável por esse índice é o continente asiático com aproximadamente 70 % do valor total de emissão. A Figura 3 mostra a distribuição do valor de emissão global entres as diferentes fontes antropogênicas para o ano de 2005.

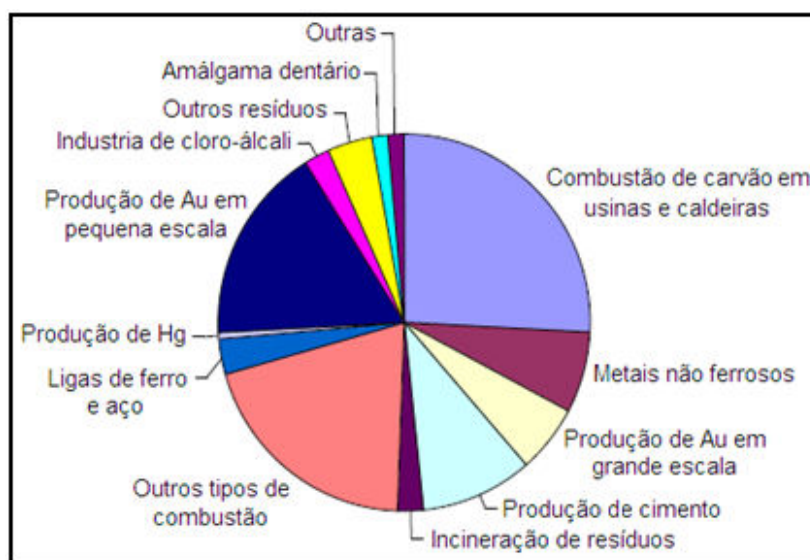


Figura 3 - Proporção global de emissões antropogênicas de Hg para atmosfera no ano de 2005. Adaptado de UNEP [30].

Apesar dos dados informados no relatório não serem atuais, é possível ter uma ideia do nível de emissão desse elemento para a atmosfera, o que vem a preocupar devido a sua toxicidade. Nesse mesmo relatório da UNEP [30] os dados para o ano de 2005 foram confrontados com um levantamento feito e publicado por Pirrone e colaboradores [31] que fora publicado em 2010. Segundo os autores, 2320 toneladas de Hg foram lançadas para a atmosfera de forma antropogênica no ano de 2010. Esses dados mostram que o nível de emissão não mudou significativamente, deixando em alerta a comunidade sobre a necessidade do monitoramento desse elemento no meio ambiente.

Em relação às emissões de Hg no Brasil, a principal fonte antropogênica que contribui é a produção de ouro em pequena ou grande escala, também conhecida como garimpo de ouro. Essa prática, além de afetar o meio ambiente quando conduzida erroneamente, também põe em risco a saúde do garimpeiro, o qual fica diretamente exposto a esse metal tóxico [32].

Para uma perspectiva futura sobre as emissões de Hg para o meio ambiente, algumas variáveis tornam-se fundamentais como o desenvolvimento de economias, desenvolvimento e implementação de tecnologias, bem como fatores ligados à mudança climática global. Além disso, legislações e acordos voluntários também contribuirão para a redução de emissões desse elemento tóxico [24].

Recentemente, Pacyna e colaboradores [24] relataram em seu trabalho três possíveis cenários para a situação global com relação a emissões de mercúrio para o ano de 2020. Em um desses cenários, os autores supõem um aumento das atividades econômicas e as práticas de controle das emissões manter-se-ão inalterados, ou seja, havendo uma tendência de aumentar ainda mais as emissões de Hg nos próximos anos. Contudo, os outros supostos cenários para o ano de 2020 são otimistas, sendo que o primeiro desses pressupõe um progresso econômico com um desenvolvimento de tecnologias industriais de controle de emissões, o qual seria empregado em todo o mundo. Já o último cenário citado pelos autores trata de uma redução máxima, ou seja, uma implementação de todas as soluções disponíveis ou medidas para controle e redução das fontes de emissão desse elemento tóxico. Segundo Pacyna e colaboradores, o cenário de redução máxima das emissões de Hg pode ser implementado, apesar dos autores informarem e discutirem as possibilidades de tendências futuras de emissões.

De um modo geral, deve haver uma conscientização global sobre emissões de Hg, uma vez que este elemento é um poluente ambiental muito perigoso, pois possui propriedades de acumular-se no meio em que se encontra e de sofrer transformações químicas, acarretando em diversos tipos de danos, tanto ao meio ambiente como a saúde humana [33].

3.1.2. Toxicidade do mercúrio

As sucessivas aplicações do Hg em diversos setores e as consequentes emissões para o meio ambiente elevam cada vez mais o nível de exposição humana a esse elemento tóxico. Além disso, o Hg possui propriedade de biomagnificação, ou seja, as suas concentrações vão aumentando progressivamente ao longo da cadeia alimentar, podendo assim refletir no

consumo de alimentos contaminados, o qual se credencia como uma das principais fontes de intoxicação humana por esse metal [34]. A Figura 4 mostra o processo de biomagnificação de Hg no meio ambiente.



Figura 4 – Concentração biológica de Hg no meio ambiente. Adaptado de Skoog e colaboradores [35]

Hoje em dia o potencial tóxico do Hg já é bem conhecido por grande parte da comunidade, o que faz com que haja uma grande preocupação ambiental com os níveis de exposição a esse elemento. Contudo, por não se ter conhecimento sobre o alto risco causado à saúde humana, antigamente vários imperadores chineses morreram por ingerir constantemente esse metal, pois, segundo eles, esse elemento possuía propriedades medicamentosas e se ingerido em grande quantidade poderia levar a “imortalidade”. Por outro lado, os antigos hindus também tinham uma visão errônea desse metal, pois atribuíam propriedades afrodisíacas a esse elemento [4].

Um dos principais casos de intoxicação por Hg ocorreu por volta de 1953 no Japão, onde uma indústria obtinha CH_3Hg^+ como subproduto após o processo de produção de acetaldeído e cloreto de vinila. Esses resíduos de Hg eram lançados nos efluentes que atingiam a baía de Minamata, levando à contaminação da cadeia alimentar aquática e refletindo em mais de duas mil pessoas contaminadas por esse metal por se alimentarem de peixes

provenientes desta baía. Esse caso ficou mundialmente conhecido como a “doença de Minamata”, o qual registou mais de mil óbitos [27, 36].

Outro caso de intoxicação por Hg também conhecido mundialmente ocorreu no Iraque por volta de 1971, onde a população alimentava-se a partir de grãos que eram contaminados por esse metal, visto que a plantação havia sido tratada com CH_3Hg^+ como praguicida. Esse caso registrou quase sete mil pessoas contaminadas e mais de 400 óbitos [27, 36]. Vários casos de intoxicação relatados na literatura ocorreram a partir da ingestão de alimentos contaminados, o que torna-se como uma das principais vias de exposição humana [4].

No Brasil, o caso mais preocupante que foi relatado é em relação a mineração de ouro na região Amazônica, o qual ocorreu durante a década de 1980. Nesse caso, estimou-se que aproximadamente 100 toneladas de Hg eram lançados anualmente, sendo a maior parte emitido para a atmosfera e o restante despejados em rios [37, 38]

Pela literatura é possível encontrar relatos de casos de intoxicação humana por esse metal a partir de equipamentos simples, como termômetros e barômetros, bem como a partir de ambientes contaminados [4, 27]. Na maioria dos casos relatados, as vítimas sofrem intoxicação através de acidentes ou por desconhecimento do perigo associado a este metal. Triunfante e colaboradores [39] reportaram dois diferentes casos clínicos em seu trabalho, onde em um deles a vítima ingeriu uma grande quantidade de Hg, na sua forma inorgânica, com o propósito de suicidar-se, o qual foi atingido após 42 dias mesmo sob um tratamento intensivo na tentativa de eliminação do metal do organismo. Conforme o caso citado, a vítima tinha conhecimento da toxicidade e por isso fez o uso desse elemento para seu suicídio. Contudo, no segundo caso relatado pelos autores, a vítima inconscientemente foi intoxicada pelo metal após utilizar um pó por engano sobre a pele, o qual se tratava de brometo de Hg ao invés de um simples talco.

O Hg pode causar diversos danos à saúde humana, uma vez que este metal possui alta afinidade por grupos tiol ($-\text{SH}$) presente em enzimas, o que caracteriza-se como uma reação muito rápida. Isso pode levar a afetar diferentes sistemas, tais como o reprodutivo, imunológico, cardiovascular, renal, respiratório, entre outros [4, 40, 41]. Contudo, o sistema mais afetado por

esse metal é o sistema nervoso central (SNC), pois uma vez intoxicado, a vítima pode apresentar sintomas como irritabilidade, fadiga, insônia, mudanças comportamentais, perda auditiva, letargia, tremores, convulsões, incoordenação motora, depressão, coma e entre outros, chegando inclusive a morte. Esses sintomas descritos estão devidamente associados ao tempo e a dose de exposição da vítima ao metal [4, 42, 43]. Segundo a EPA [44], a dose letal para o Hg na sua forma inorgânica para uma pessoa adulta de aproximadamente 70 Kg é de 14 a 57 mg Kg⁻¹ do metal. Já para a forma orgânica desse elemento, a agência divulga um valor que varia de 20 a 60 mg Kg⁻¹ para um adulto com o mesmo peso do caso anterior.

O SNC possui um fundamental papel sobre os sentidos de todas as partes do corpo humano e está localizado dentro do esqueleto axial (cavidade craniana e canal vertebral), o qual depende quase que exclusivamente da energia proveniente da glicólise para o seu perfeito funcionamento, diferenciando-se de outros tecidos os quais podem utilizar como fonte energética a degradação de lipídeos [45-47]. Para se ter uma ideia da necessidade de energia para esse sistema, o cérebro sozinho necessita de aproximadamente 120 g de glicose ao dia, o que representa mais do que a metade de toda a glicose armazenada no músculo e fígado [46]. A Figura 5 mostra um esquema da rota de degradação da glicose e a consequente formação de acetil coenzima A (Acetil-CoA), para a posterior entrada no ciclo do ácido cítrico (também conhecido como ciclo de Krebs) e formação de energia.

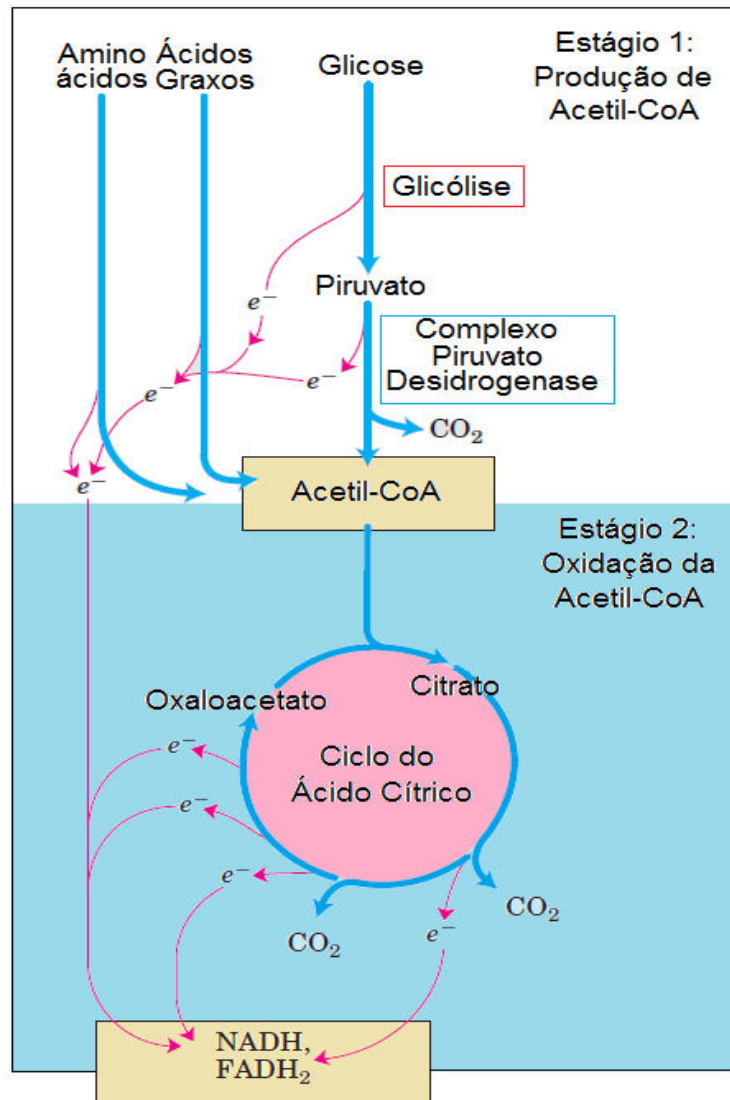
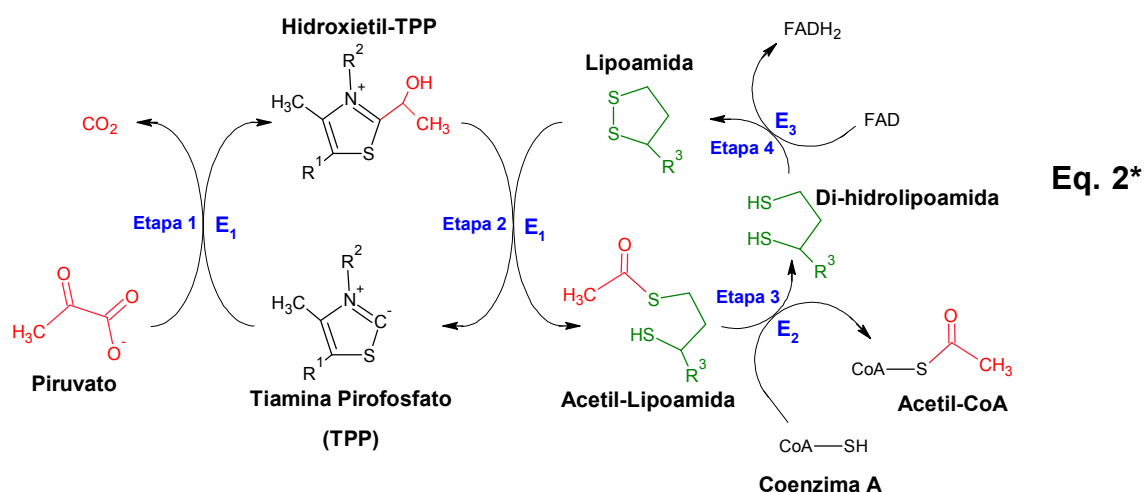


Figura 5 – Vias metabólicas com destaque para a degradação da glicose para posterior oxidação da Acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico. Adaptado de Nelson e Cox [46].

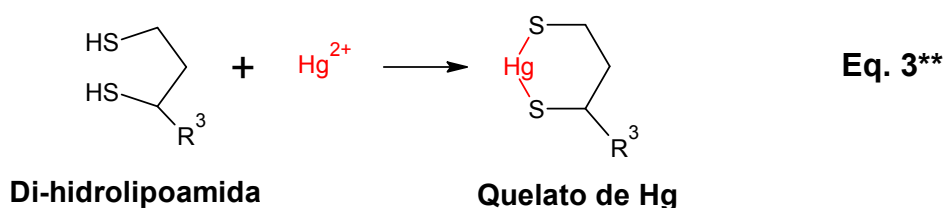
Como pode ser visto pela Figura 5, após a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA, tem-se a entrada no ciclo do ácido cítrico, a qual é a via metabólica celular mais importante. Em um terceiro estágio que não foi mostrado na Figura 5, tem-se o processo de fosforilação oxidativa, na qual os elétrons são transportados para uma cadeia mitocondrial e ao final do processo tem-se a formação de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) [46].

A formação de acetil-CoA a partir do piruvato se dá por meio do complexo de piruvato desidrogenase, o qual é composto por 3 enzimas

denominadas componente piruvato desidrogenase (E_1), di-hidrolipoil transacetilase (E_2) e di-hidrolipoil desidrogenase (E_3). Uma vez desativado esse complexo, a reação de formação do acetil-CoA é inibida e, assim, o SNC fica sem fonte energética [47]. A Equação 2 mostra as etapas da reação de formação do acetil-CoA a partir do piruvato.



Conforme o Esquema 2, percebe-se que na etapa 3 da reação tem-se a formação da di-hidrolipoamida que contém grupamentos $-SH$ vizinhos. Como já comentado anteriormente, o Hg pode interagir fortemente com grupos de enxofre, o que caracteriza como sendo um dos principais casos que leva a bioacumulação em peixes e a toxicidade em seres humanos [48]. Sendo assim, o Hg pode ligar-se à molécula de di-hidrolipoamida, inativando a etapa 4, o qual trata-se da regeneração da forma oxidada da lipoamida e, assim, parando o ciclo catalítico de formação de acetil-CoA [47]. A Equação 3 mostra a reação de formação do quelato de Hg a partir da enzima.



* Adaptado de Nelson e Cox [45].

** Adaptado de Berg e colaboradores [46].

Isso explica os danos causados no SNC quando uma vítima é exposta a Hg, pois com a formação do quelato de Hg com a enzima não há formação da acetil-CoA que é a chave principal de entrada no ciclo de Krebs.

Para um possível tratamento a intoxicação por Hg, uma alternativa é o uso de medicamento que contenha grupos $-SH$ adjacentes, uma vez que haverá uma competição entre os grupos pela ligação com o íon metálico. Assim tem-se a recuperação da molécula de di-hidrolipoil e o novo quelato formado poderá ser eliminado por meio de excreção urinária [47]. Alguns agentes quelantes que podem ser empregados para tal finalidade podem ser encontrados na literatura, tais como ácido 2,3-dimercaptopropano-1-sulfônico (DMPS), ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), D-penicilamina e 2,3-dimercaptopropanol (BAL) [49]. A Figura 6 mostra a estrutura para esses agentes quelantes, com o destaque para o grupo $-SH$ presente.

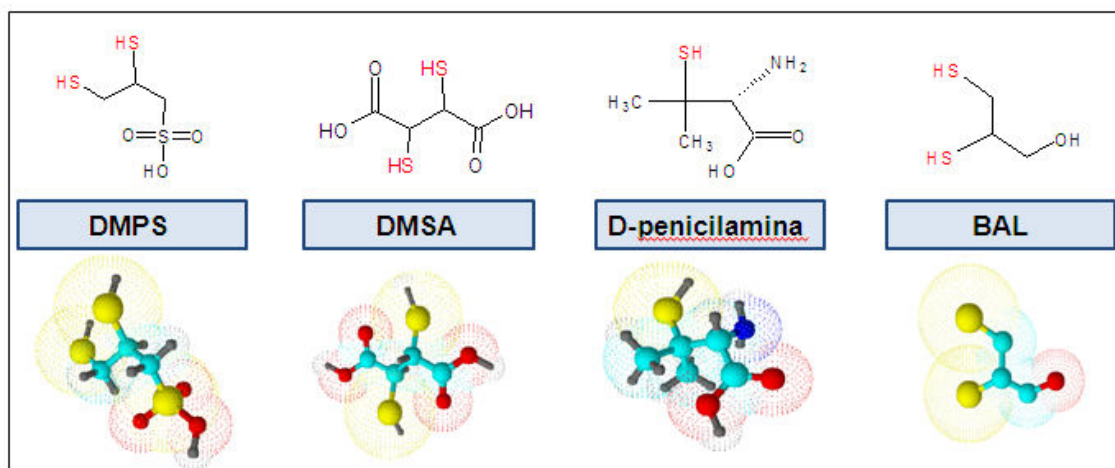


Figura 6 – Agentes quelantes utilizados para o tratamento de intoxicação por Hg. Adaptado de Guzzi e La Porta [49].

3.1.3. Mercúrio em amostras biológicas

Com a exposição humana e a consequente bioacumulação de Hg no organismo, torna-se importante o monitoramento do nível deste metal através de indicadores biológicos. Um desses indicadores amplamente utilizado para tal finalidade é o cabelo, pois este é capaz de apresentar informações sobre o tempo de exposição humana ao metal, além de ser uma amostra de fácil

obtenção [50, 51]. Essa análise através do cabelo é possível devido a absorção dos elementos a partir da raiz, o qual está relacionado diretamente com a concentração do elemento presente nos fluidos (sangue, linfa, e fluido extracelular) [52].

Outros tipos de indicadores biológicos que também podem ser usados para avaliar a concentração de Hg são o sangue e a urina. Contudo, a concentração encontrada em uma análise de amostra de sangue é inferior àquela encontrada em amostra de cabelo. Segundo Gill e colaboradores [51] essa diferença pode variar entre 150 a 200 ordens de grandeza. Isso possivelmente se dá devido a capacidade do cabelo apresentar níveis de contaminação por meio exógena e endógena. Com relação ao outro tipo de indicador biológico, Pozebon e colaboradores [52] relacionaram as desvantagens da análise de urina em relação à análise de cabelo. Segundo os autores, a urina traz informação com respeito a um curto período de tempo, além de não poder comprovar evidências e ser uma prova evasiva.

Análise de monitoramento de contaminantes em cabelo ganhou muito destaque nos últimos anos, pois atualmente tal análise vem sendo empregada em várias instituições para fins de admissão e controle em funcionários [53].

Conforme já citado anteriormente, o consumo de produtos alimentícios contaminados por Hg torna-se uma das principais formas de intoxicação humana por esse elemento [4]. Sendo assim, fica evidente a necessidade do controle de qualidade, a fim de evitar que alimentos desse gênero venham a chegar a mesa do consumidor. Os alimentos mais preocupantes são aqueles de origem marinha, pois apesar dos peixes apresentarem um alto valor nutricional, possuem a capacidade de absorver e acumular os metais tóxicos presentes no meio [54, 55].

Níveis máximos para Hg presente em produtos de origem marinha foram publicados pela comissão de regulação da União Europeia (UE), os quais foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo, o limite máximo permitido é de $0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ em massa úmida, o que abrange os produtos de pesca com exceção de peixes predadores. Já no segundo grupo, o limite é o dobro do valor estabelecido para o grupo anterior, ou seja, o valor estabelecido é de $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ e inclui produtos de carnes de peixes predadores [56]. Com relação a

legislação brasileira, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também publicou os níveis máximos para esse elemento, onde os valores e as divisões são as mesmas já citadas para a UE [57].

O Hg também pode causar danos à saúde humana por meio de ingestão de alimentos cárneos de animais terrestres, pois o descaso com o meio ambiente pode levar à deposição desse elemento em solos e em vegetais, o que está diretamente relacionado com o meio de alimentação de animais de origem bovina, suína e entre outros [4]. Com isso, diante dos vários danos que esse elemento pode trazer à sociedade, há uma necessidade do desenvolvimento de metodologias seguras para o controle de Hg em diversos tipos de amostras, não somente de origem biológica, conforme já mencionado, mas também em amostras ambientais como solos, águas, ar e entre outros.

3.2. Determinação de mercúrio

A análise química tem como principal meta a determinação de diferentes tipos de espécies químicas em diversos tipos de amostras. Para isso, deve-se levar em consideração algumas etapas essenciais para a realização da análise desejada. Essas etapas constituem uma sequência analítica, e estão dispostas como definição do problema, escolha do método, amostragem, preparo das amostras, calibração, medida, avaliação e ação [15].

Para a determinação de Hg, é necessária extrema atenção principalmente na etapa de amostragem e preparo das amostras, pois uma vez mal conduzidas essas etapas, pode haver uma grande probabilidade de erro nas análises por perdas do analito por volatilização e/ou adsorção. Além disso, quando se realiza uma análise de qualquer natureza, é indispensável à prevenção de qualquer tipo de contaminação, seja na amostra ou no material a ser utilizado. Para isso, deve-se manter o laboratório em perfeito estado de limpeza, proporcionar uma ventilação adequada, manter sempre o material de laboratório descontaminados e utilizar reagentes de alto grau de pureza [58, 59].

Para as análises de uma forma geral, o nível de contaminação alcançado pode ser acompanhado a partir do branco analítico, o qual trata-se de uma solução que passa por todas as etapas do procedimento analítico, mas

sem conter a amostra e/ou elemento a ser estudado. Contudo, quando realizada a sequência analítica com cautela, é possível obter resultados confiáveis para o teor de Hg presente nas amostras estudadas [15, 59].

Análises para a determinação de Hg total são extremamente importantes, pois assim é possível obter informação do nível total do elemento presente na amostra em estudo. Contudo, determinações quantitativas distintas de cada espécie de Hg são atrativas, devido aos diferentes efeitos que essas espécies podem apresentar tanto a saúde humana como para o meio ambiente. Esse processo de determinação de diferentes espécies é chamado de análise de especiação e se dá principalmente para a distinção de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ [59, 60].

Outra etapa fundamental é a escolha da técnica para a determinação de Hg, pois dependendo da concentração do elemento presente na amostra, essa técnica deve apresentar alta sensibilidade, pois isso proporciona “análises finas”, ou seja, determinação do elemento a nível traço ou ultra traço. Além disso, é importante também levar em consideração a natureza e a quantidade de amostra para proceder as análises [3, 61].

Considerando a metodologia adotada e a finalidade das análises, Chasin e colaboradores [62] relataram em seu estudo que é necessário apresentar alguns parâmetros de validação a fim de garantir uma maior confiabilidade nos dados originados, tais como linearidade, curva de calibração, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, recuperação, especificidade, estabilidade e robustez. O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o qual é responsável pela avaliação da qualidade de produtos e serviços nacionais, também informa as técnicas aplicáveis à validação de métodos analíticos, no âmbito de orientar os laboratórios a obterem resultados com a qualidade exigida [63].

3.2.1. Métodos óticos de análise para a determinação de Hg

De acordo com a literatura, diversas técnicas para determinação de Hg podem ser empregadas. Contudo, além dos parâmetros já citados anteriormente, a técnica adotada deve apresentar alta sensibilidade e seletividade como características [4, 33]. Dentre essas técnicas, destacam-se a

espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG AAS) ou com forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV AFS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [3, 33]. A Figura 7 faz uma relação entre os limites de detecções (LDs) associados a estas respectivas técnicas de análises para a determinação de metais de uma forma geral.

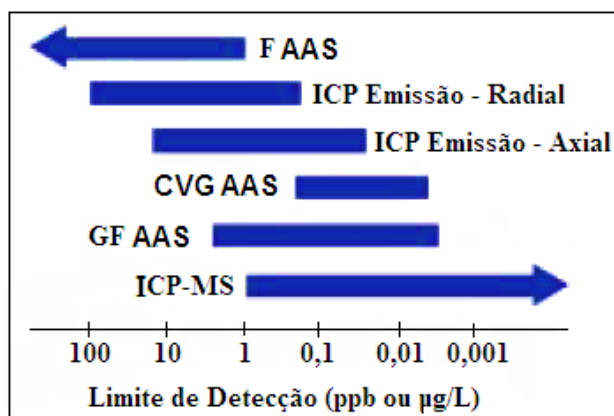


Figura 7 - Faixa de limite de detecção para alguns métodos óticos de análise. Adaptado de PerkinElmer [64].

A Figura 7 faz uma comparação entre as técnicas com relação ao LD, o qual trata-se, segundo a ANVISA [65], da menor quantidade de uma substância química que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente ser quantificado sob as condições do procedimento analítico. O LQ também pode ser estabelecido e diferenciado para cada técnica, uma vez que trata-se da menor quantidade da substância química que pode ser encontrada com precisão e exatidão aceitáveis para as condições adotadas no procedimento [65]. Para ambos os parâmetros, existe o limite de detecção e quantificação instrumental (LD_i e LQ_i), o qual é diferenciado do limite de detecção e quantificação do método (LD_M e LQ_M). O LD_i e LQ_i são estabelecidos a partir de uma resposta instrumental que uma dada concentração de analito é capaz de produzir. Já para o LD_M e LQ_M a diferença é que para o cálculo leva-se em consideração as variáveis do procedimento, ou seja, está relacionado com o

sinal gerado a partir da amostra que foi submetida a todo o processo analítico [62][66].

A equação para a determinação do LD é dada a partir de um fator multiplicativo ($k = 3$) e a fração entre o desvio padrão (SD) da leitura de dez sinais do branco e a sensibilidade (S). Para o LQ, a diferença na equação é apenas o fator multiplicativo, o qual trata-se de $k = 10$ [65, 67]. Essas relações estão dispostas conforme a Equação 4A e 4B, respectivamente.

$$\text{LD} = 3 \times \text{SD}/\text{S} \qquad \text{LQ} = 10 \times \text{SD}/\text{S} \qquad \text{Eq. 4 (A e B)}$$

Conforme a Figura 7, é possível notar que as técnicas que apresentam menores LDs são CVG AAS, GF AAS e ICP-MS, caracterizando-se também como técnicas precisas, uma vez que quanto menor o desvio padrão entre as leituras menor será o LD. Contudo, como já citado anteriormente, a CV AFS também se apresenta como uma técnica usual para a determinação desse elemento, porém a sua dimensão em termos de LD não é representado na Figura 7. Micaroni e colaboradores [3] elaboraram uma revisão sobre Hg, no qual os autores destacam que a faixa de LD alcançado pela CV AFS pode chegar até uma ordem de grandeza menor do que para a CV AAS.

De uma forma geral, as técnicas citadas são as mais utilizadas para tal finalidade, podendo ainda ser acopladas a outras técnicas com o objetivo de alcançar uma maior sensibilidade e menores LDs, das quais é possível citar o uso da cromatografia gasosa ou líquida e a eletroforese capilar. Contudo, o uso de técnicas combinadas pode tornar-se inviável devido ao alto custo do funcionamento instrumental. Sendo assim, é preferível o uso de técnicas simples e confiáveis, que torna-se viável para o uso de rotina e em pesquisa na determinação de Hg [68].

Recentemente, a literatura reporta vários estudos utilizando o acoplamento de uma lâmpada UV a técnicas de análise, ou seja, fazendo o uso da *photo*-CVG. A radiação proveniente da lâmpada é capaz de reduzir o vapor de Hg por meio de um mecanismo que envolve a formação de radicais orgânicos advindos do meio em que se encontra o analito [69]. Tal técnica vem sendo explorada com sucesso para a determinação desse elemento em

diversos tipos de matrizes, pois além de ser uma técnica simples, substitui reagentes caros e instáveis para o processo de redução química, utilizando apenas um precursor orgânico, como o ácido fórmico, para tal processo [8, 20, 70].

3.2.2. Espectrometria de absorção atômica (AAS)

O nascimento da AAS surgiu a partir da observação de um espectro solar, no qual foi possível perceber a existência de algumas linhas pretas devido ao processo de absorção na atmosfera solar. Contudo, o princípio da espectrometria atômica começou a ser melhor entendido com um experimento realizado por Kirchhoff e Bunsen em 1860, o qual baseava-se na utilização de um sal de sódio que era aquecido sobre uma chama e o espectro gerado era então avaliado. Este estudo ficou conhecido como “reversão de linhas”, o qual a partir dele foi possível concluir que todos os corpos podem absorver radiação na mesma intensidade emitida [71].

Alguns anos depois, por volta de 1952, Alan Walsh apresentou as condições experimentais necessárias para aplicação da AAS, o que rendeu a ele um grande reconhecimento na comunidade científica, pois passou a ser considerado o “pai” da AAS moderna. Em 1954 o primeiro modelo de um instrumento é apresentado e patenteado com base nas ideias de Walsh, o qual publicou seu primeiro artigo [72] em 1955 em uma revista científica denominada *Spectrochimica Acta* [71].

Nas décadas seguintes, a AAS ganhou um grande destaque no cenário científico, pois é amplamente utilizada para a determinação de diversos elementos em baixas concentrações nos mais variados tipos de amostras. Isso se dá devido a essa técnica possuir características de alta sensibilidade e seletividade, aliando simplicidade com baixo custo [73, 74].

Essa técnica geralmente é monoelementar e baseia-se na medida da intensidade de absorção de energia por átomos no estado fundamental e gasoso. Consequentemente, após a absorção de energia, tais átomos passaram para um estado excitado de maior energia, conforme mostrado na Figura 8 [71].

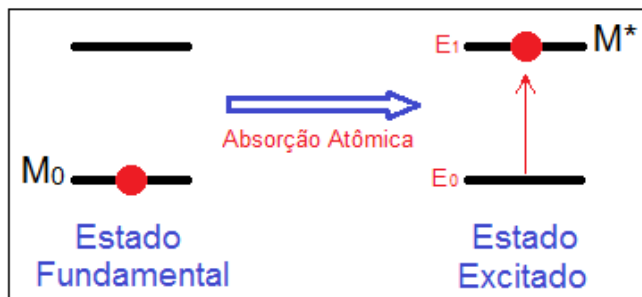


Figura 8 – Processo de absorção atômica.

A energia (E) necessária para o processo de absorção atômica é específica de cada átomo e está relacionada com a frequência (ν) e o comprimento de onda (λ) da radiação envolvida [71, 75]. A relação existente entre essas grandezas pode ser entendida conforme apresentado na Equação 5, onde h é a constante de proporcionalidade (constante de Planck) e c a velocidade da luz.

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Eq. 5}$$

Essa relação apresentada na Equação 5 explica os espectros eletromagnéticos de energia, onde quanto maior a frequência, maior será a energia ou quanto maior o comprimento de onda, menor a frequência e, consequentemente, menor a energia [75].

Outra relação importante é a lei de absorção ou lei de Lambert-Beer, pela qual é possível perceber que a concentração de um dado analito é diretamente proporcional a sua absorvância. A Equação 6 mostra essa relação, onde ϵ é a constante de proporcionalidade ou absortividade molar (com unidades de $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b é o caminho ótico do meio absorvente e c é a concentração de uma espécie [75].

$$A = \epsilon bc \quad \text{Eq. 6}$$

Em AAS, o processo de absorção de átomos se dá após esses serem atomizados no estado fundamental, formando uma nuvem atômica no caminho

ótico. A atomização pode ser realizada em chama (F AAS), forno de grafite (GF AAS), Filamentos ou em tubos (ex. quartzo) para as técnicas de geração de vapor (VG AAS). A Figura 9 mostra os componentes básicos de um espectrômetro com destaque para os tipos de atomizadores que podem ser empregados comercialmente.

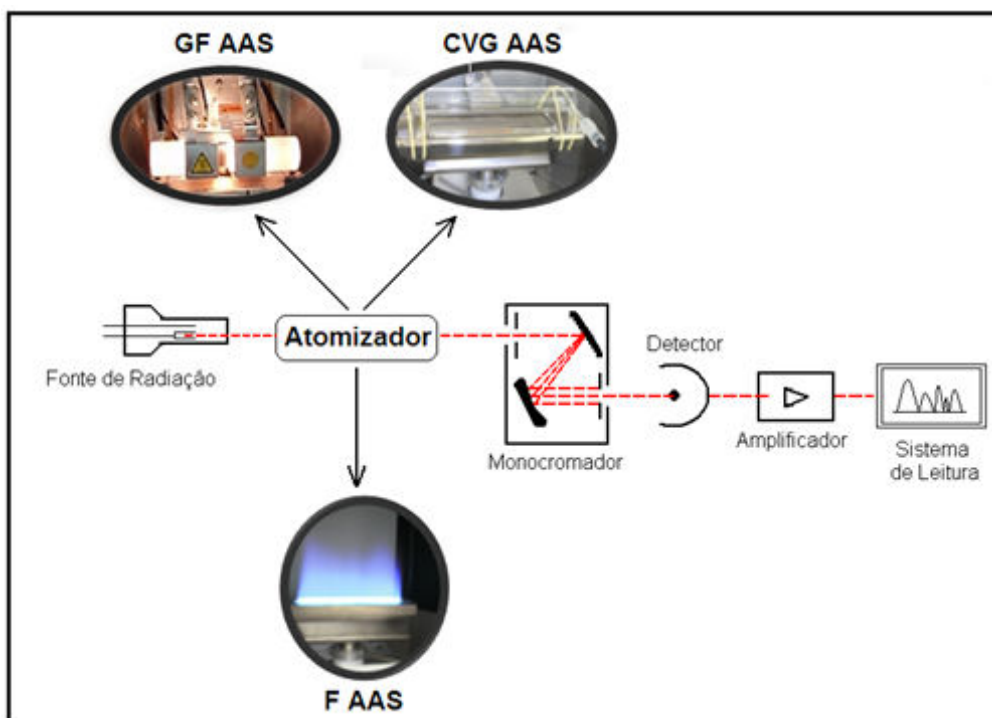


Figura 9 – Componentes básicos de um espectrômetro de absorção atômica.

A forma mais usual de introdução de amostra é por meio de nebulizadores pneumáticos, a fim de obter um aerossol líquido para a determinação de elementos químicos por F AAS. Contudo, aproximadamente 90 % da solução de amostra aspirada não chega até o atomizador, sendo conseqüentemente descartada [6]. Para a determinação de Hg, a técnica de F AAS, apesar de ser bastante simples, não é recomendada devido a sua baixa sensibilidade e susceptibilidade a interferentes espectrais [3].

A técnica de GF AAS possui alta sensibilidade para a determinação desse elemento, o que leva a várias aplicações em diferentes tipos de amostras. Contudo, devido à alta volatilidade do Hg, estudos referentes a modificadores químicos são reportados como fundamentais nesse tipo de análise, pois a adição de soluções modificadoras levam à complexação do Hg,

suportando temperaturas mais elevadas durante o programa de aquecimento do forno de grafite [76, 77]. Informações mais detalhadas sobre essa técnica serão apresentadas no segundo capítulo desta dissertação.

A técnica mais usual e explorada para a determinação de Hg é a CV AAS, justamente pela alta volatilidade desse elemento, podendo assim ser separado da matriz por meio de uma reação química e carreado até uma cela de quartzo que fica posicionada no caminho ótico do espectrômetro [3, 6].

3.2.3. Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor

A VG AAS é uma técnica bastante difundida para a determinação de metais e metaloides, pois trata-se de um processo em que espécies químicas são convertidas a compostos voláteis, resultando então na transferência dos analitos da fase condensada para a fase gasosa [78].

O Hg é o único elemento químico que possui uma elevada pressão de vapor, 0,0016 mbar em 20 °C, o que atribui a esse elemento a vantagem de ser determinável a temperatura ambiente, ou seja, não há necessidade de uma atomização térmica para a redução deste elemento para o estado fundamental. Essa técnica é então conhecida como CV AAS (do inglês, *cold vapor atomic absorption spectrometry*) [71].

A técnica de CV AAS começou a ser estudada na década de sessenta para a determinação de Hg. Hath e Ott [79] fizeram uma das primeiras publicações sobre esse assunto, na qual esses autores usaram sulfato de estanho (SnSO_4) como meio redutor e o vapor de Hg gerado podia então ser carreado, com o auxílio de um gás (ar, N_2 ou Ar), até uma cela, sendo posteriormente medido. Contudo, os créditos à CV AAS para a determinação de Hg devem ser atribuídos a Poluektov e Vitkun, pois esses pesquisadores foram os primeiros a utilizar sais de Sn para a redução do Hg^{2+} a Hg^0 e combinar essa reação com a AAS [71].

Posteriormente aos estudos realizados com Hg, pesquisadores conseguiram expandir a geração de vapor para outros elementos. Em 1969, Holak [80] desenvolveu estudos para a determinação de arsênio a partir da formação de arsina (AsH_3), o qual trata-se de uma espécie volátil,

possibilitando assim a sua condução até um espectrômetro. Contudo, os estudos até então estavam sendo realizados com Hg, com o qual era possível análise sem a necessidade de aquecimento para atomização devido à alta pressão de vapor desse metal. Para a determinação de As, esse procedimento a temperatura ambiente não poderia ser adotado, pois para manter esse elemento em seu estado fundamental e gasoso são necessárias elevadas temperaturas, quebrando assim a ligação hidrogênio-metal na espécie de arsina gerada. Para isso, o pesquisador conectou a saída do sistema utilizado para geração de AsH_3 diretamente em um capilar, pelo qual o vapor era aspirado e conduzido até a chama em AAS [80].

Os estudos para a formação de hidretos voláteis eram realizados com a adição de metais, como Zn, Al ou Mg, em soluções ácidas [6]. Isso foi relatado, por exemplo, por Holak [80], o qual fez o uso de Zn metálico para a formação de AsH_3 . Contudo, a adição desses metais levava a uma restrição de aplicabilidade da técnica, pois havia a formação de poucos hidretos voláteis, basicamente a AsH_3 e SeH_2 . Além disso, problemas com reprodutibilidade e elevados valores de brancos analíticos também estariam associados à adição desses metais.

Essa situação pôde então ser contornada em 1972, pois Braman e colaboradores [81] relataram em seu estudo o uso de tetrahidroborato de sódio (NaBH_4) como reagente redutor para a determinação de As e Sb, após a formação dos hidretos AsH_3 e SbH_3 , respectivamente. O uso desse reagente fez impulsionar os estudos em VG, pois alguns anos depois do primeiro trabalho publicado usando o NaBH_4 , foi reportado por pesquisadores a possibilidade de formação de hidretos voláteis de As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn e Te. Essa possibilidade de determinação de elementos pela formação de hidretos voláteis ficou conhecida como espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) [6, 71]. Mais recentemente, outros elementos foram determinados por meio de reação com NaBH_4 , tais como Ag, Au, Cd, Cu, Hg, In, P, Tl e Zn [6, 82, 83].

A concentração ideal de NaBH_4 para estudos em geração de hidretos deve ser investigada, uma vez que essa pode variar dependendo do elemento químico a ser determinado, do equipamento e/ou tipo de sistema utilizado para

a geração. Além disso, a solução deve ser preparada em meio alcalino (KOH ou NaOH) a fim de garantir estabilidade, o que reflete em uma maior eficiência e reprodutibilidade [6].

A determinação de metais pela técnica de VG se dá geralmente por meio de sistemas de fluxo contínuo (CF) ou por injeção em fluxo (FI). Como característica comum, destaca-se que para ambos os sistemas, o reagente redutor e a amostra encontram-se em um ponto de confluência e passam por uma bobina de reação. Posteriormente, a fase gasosa formada, que contém o analito de interesse, é então separada da fase líquida através de um componente denominado separador gás/líquido (GLS). Outra característica interessante é que ambos os sistemas podem ser facilmente automatizados [71]. A Figura 10 mostra os dois sistemas mencionados, pela qual é possível um melhor entendimento sobre o funcionamento de ambos.

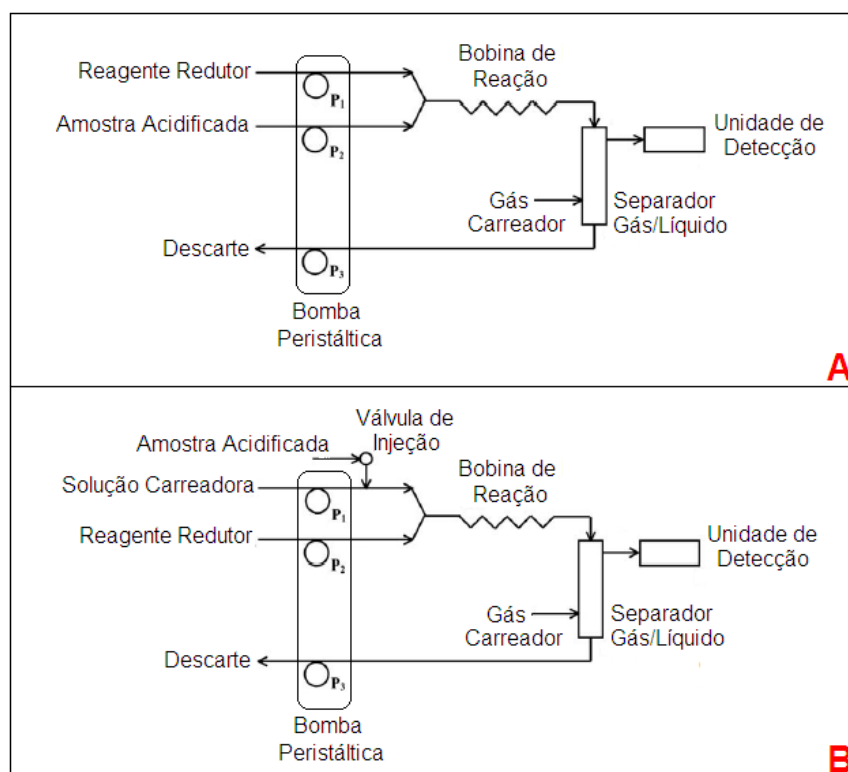


Figura 10 – Esquemas de sistema de fluxo contínuo (A) e injeção em fluxo (B) para geração química de vapor. Adaptado de Pohl [84].

Conforme pode ser visualizado na Figura 10, a diferença entre os sistemas é basicamente a quantidade de amostra que participa da reação de

geração de vapor, pois no CF a amostra é aspirada continuamente juntamente com os demais reagentes, obtendo um sinal analítico também de forma contínua. Já no FI, um pequeno volume de amostra é injetado em um canal onde uma solução carreadora é aspirada, gerando assim um sinal analítico de forma transiente, podendo ser avaliado por integração em área ou altura. Além disso, o sistema FI apresenta algumas vantagens em relação ao CF, tais como maior frequência analítica, reprodutibilidade e simplicidade de operação [71, 85, 86]. Contudo, o uso de ambos os sistemas é bastante reportado na literatura para determinação de espécies voláteis por técnicas de espectrometria atômica [84].

Outro tipo de sistema que também pode ser utilizado para o processo de VG é em batelada, no qual é operado pelo princípio de que os vapores contendo o analito são gerados em um frasco de reação, sendo diretamente conduzido à cela de quartzo. Esse frasco de reação tem a função do separador gás/líquido, diferenciando-se assim dos demais sistemas em fluxo citados anteriormente [71]. Um esquema do sistema em batelada está apresentado na Figura 11.

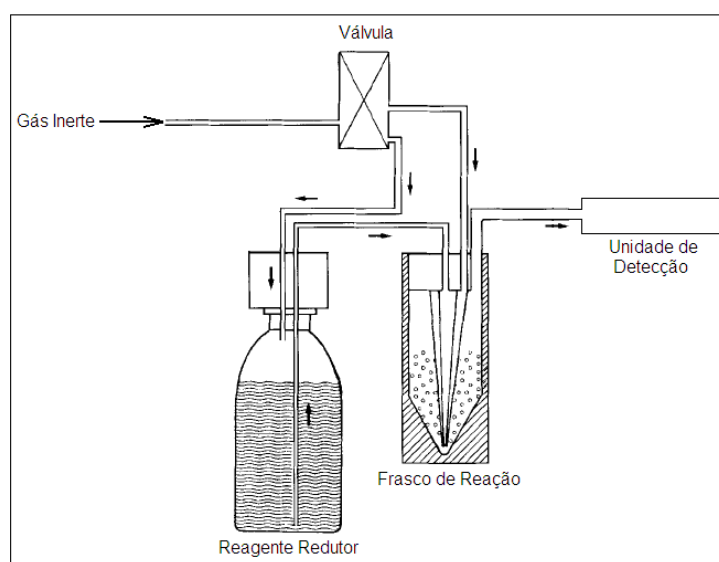
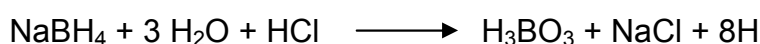


Figura 11 – Esquema de sistema em batelada para CVG. Adaptado de Welz e Sperling [71].

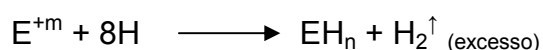
O sistema em batelada apresenta algumas desvantagens frente aos demais sistemas em fluxo. Entre esses, pode-se destacar o grande volume de solução presente no frasco de reação, podendo afetar assim a sensibilidade do procedimento. Além disso, esses sistemas geralmente são manuais, o que reflete em um maior tempo para cada análise e, conseqüentemente, uma menor frequência analítica [71].

Independente do sistema utilizado, a VG envolve basicamente três etapas, tais como a geração da espécie volátil por meio de reação química, o transporte desse vapor até uma unidade de detecção e a atomização ou ionização do elemento de interesse. Contudo, quando se refere à formação de espécies voláteis, é necessário entender o mecanismo envolvido, principalmente a formação de hidretos com o uso de NaBH_4 , o qual é o reagente redutor frequentemente utilizado [6, 84].

A primeira proposta de mecanismo para a reação utilizando o NaBH_4 foi proposta por Robbins e Caruso [87] em 1979. Neste estudo, os autores descrevem que o hidreto é gerado a partir do hidrogênio atômico ou “nascente”, o qual é formado pela hidrólise ácida do reagente redutor. A Equação 7 mostra tal mecanismo, onde E representa o analito, m é o estado de oxidação desse analito e n é o número de coordenação do hidreto formado.



Eq. 7 (A e B)*



O mecanismo descrito na Equação 7 é conhecido como mecanismo do “hidrogênio nascente”, sendo adotado por muitos anos como possibilidade para descrever o processo de geração de hidretos voláteis. Contudo, vários outros pesquisadores vem questionando tal mecanismo com base em conceitos termodinâmicos [88], como por exemplo, Laborda e colaboradores [89] que contestam a capacidade de geração do hidrogênio nascente e a sua ação como agente redutor.

Pesquisadores continuavam a estudar o verdadeiro mecanismo, na tentativa de entender de onde advém o hidrogênio que forma o hidreto volátil.

* Adaptado de Robbins e Caruso [83].

Uma importante contribuição para entender o mecanismo foi realizada por Pergantis e colaboradores [90], os quais utilizaram um espectrômetro de massas para estudar a geração de AsH_3 a partir de reagentes deuterados. Segundo esses autores, quando se fez o uso de NaBH_4 em DCl e D_2O obteve-se como principal produto o AsH_3 , ou seja, o hidrogênio para a formação da arsina é proveniente do reagente redutor. Isso pode ser confirmado com um segundo experimento realizado pelos autores, os quais fizeram o uso de NaBD_4 em HCl e H_2O e o produto predominante foi AsD_3 .

Semelhantemente, D'Ulivo e colaboradores [88] usaram reagentes deuterados para também avaliar o verdadeiro mecanismo envolvido. Os autores utilizaram como reagente redutor uma mistura $\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$ em diferentes frações molares, o que mostrou uma maior tendência de formação das respectivas espécies deuteradas (AsD_3 , BiD_3 e SbD_3) a medida que a fração molar de NaBD_4 era aumentada. As evidências apresentadas por este estudo estão de acordo com os resultados apresentados por Pergantis e colaboradores [90], onde em ambos os trabalhos os autores relatam que o mecanismo de formação do hidreto não é a partir do hidrogênio “nascente”.

A recente proposta de mecanismo de geração do hidreto é baseada na formação de um complexo analito-borano (ABC), como intermediário, e transferência de hidrogênio ligado diretamente ao boro [88, 91, 92]. A Figura 12 mostra um esquema desse mecanismo, onde M representa o analito que está ligado à outra espécie, formando assim um substrato (ML_n). À medida que são formadas espécies de ABC, há transferência de hidrogênios e consequente substituição de um ligante, formando o hidreto ao final do processo.

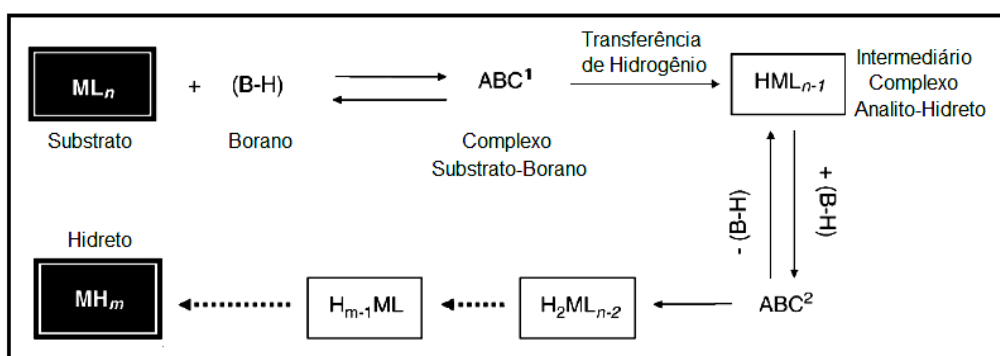


Figura 12 – Esquema do mecanismo de geração de hidretos utilizando NaBH_4 . Adaptado de D'Ulivo [91].

Os estudos recentes mostram evidências que o verdadeiro mecanismo é conforme apresentado na Figura 12, derrubando assim a teoria de geração a partir do hidrogênio “nascente” [91]. Certamente as pesquisas sobre VG continuarão nos próximos anos, na tentativa de explorar ainda mais os conhecimentos sobre as reações envolvidas. Além desses estudos, é notável o crescimento em termos de aplicabilidade dessa técnica, uma vez que possui destacáveis vantagens sobre as demais formas de introdução de amostras em espectrometria atômica.

Dentre as principais vantagens da técnica de VG, pode-se citar a prévia separação do analito da matriz, ou seja, a geração da espécie volátil contendo o analito é o único componente da amostra que é encaminhado até a cela de atomização, evitando assim possíveis interferências advindas da matriz da amostra no momento da leitura instrumental. Essa eficiência na introdução da amostra e, conseqüentemente, o transporte do vapor atômico gerado, proporciona a essa técnica uma maior sensibilidade e um menor LD. Outro ponto positivo que também merece destaque é a possibilidade de acoplamento a diferentes sistemas de detecção, podendo assim explorar estudos de especiação e pré-concentração de analitos [6, 78].

Por outro lado, essa técnica também pode apresentar algumas desvantagens, como por exemplo, a existência de concomitantes na solução de leitura, o que poderá interferir na reação de geração do vapor atômico. Outro fator que também pode vir a prejudicar a reação é o estado físico da solução (como a densidade, viscosidade, entre outros), o que está diretamente ligado a cinética de geração de vapor. Além desses, outros pontos que podem tornar-se críticos e afetar significativamente a VG é a concentração dos reagentes e o estado de oxidação do analito [6].

De acordo com a literatura, além da CV AAS e HG AAS, existem outras formas de se gerar vapor, tais como reações de alquilação, geração de haletos ou geração de derivados carbonilados [78]. Contudo, a forma comumente empregada é a HG AAS, o qual abrange uma larga faixa de elementos da tabela periódica, quando comparada com as demais formas de geração citadas. Especificamente para a geração de espécies voláteis de Hg, a forma mais usual, além da HG, é a CV AAS. A Figura 13 indica os elementos aptos à

VG por meio de ambas as formas de geração química e detecção por técnicas de espectrometria atômica.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

Figura 13 – Indicação de elementos da tabela periódica aptos a VG, onde os azuis indicam a HG AAS e em amarelo a CV AAS. Adaptado de Sturgeon e Mester [78] e Pohl [84].

3.2.3.1. Geração de vapor frio (CV AAS)

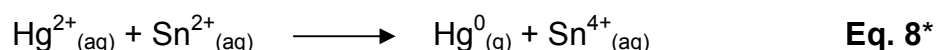
Conforme já mencionado na seção anterior (3.2.3), os primeiros estudos com VG e detecção por técnica de espectrometria atômica surgiram com a determinação de Hg. Esse elemento tem características próprias, o que lhe confere a possibilidade de ser detectável pela técnica de CV AAS [71].

Antes das primeiras evidências do uso de NaBH_4 como reagente redutor para a VG, a opção mais utilizada era o SnCl_2 , principalmente para a determinação de Hg, pois, apesar de ser um redutor mais fraco, é frequentemente empregado até hoje na técnica de CV AAS [7]. Como vantagem desse reagente, pode-se citar a susceptibilidade a interferências causada por metais de transição, a qual é menor do que quando se faz o uso de NaBH_4 . Entretanto, a reação de redução é mais lenta, requerendo assim o auxílio de um gás adicional para purga, a fim de garantir uma eficiente separação gás/líquido [7, 78]. Essa necessidade de gás adicional não é tão acentuada quando se usa o NaBH_4 pois além da produção de hidretos, tem-se também a geração de gás hidrogênio, o qual ajuda na condução do vapor [71].

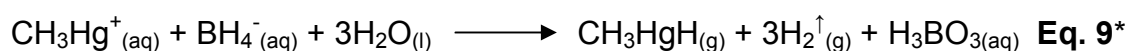
Contudo, concentrações elevadas desse reagente podem levar a produção acentuada de hidrogênio, diminuindo assim a intensidade do sinal analítico, devido à diluição do vapor atômico [93].

Como visualizado na Figura 13, outro elemento que também pode ser determinado a partir de CV é o Cd. Alguns dos primeiros trabalhos relatando tal geração foram publicados em 1995, nos quais se fazia o uso de NaBH₄ para a redução desse elemento [78]. Além disso, segundo Guo e Guo [94, 95] é necessária a adição de um reagente orgânico como catalisador para aumentar a eficiência de geração de vapor de Cd. Esses autores então fizeram o uso de tiouréia, o qual é capaz de formar complexos de Cd solúveis em água. Outro trabalho semelhante foi descrito por Sanz-Medel e colaboradores [96], mas esses autores utilizaram brometo de didodecildimetilamônio (DDAB) como meio orgânico na reação de geração. De acordo com os estudos descritos para a determinação de Cd, é notável que uma maior simplicidade em CV é obtida para a determinação de Hg, pois para esse elemento não é necessário a utilização de reagentes adicionais para compor a reação de geração.

Considerando então a geração de vapor de Hg por CV, a reação de redução desse elemento com SnCl₂ é dada conforme mostrado na Equação 8.



Conforme visualizado na Equação 8, a redução de Hg se dá apenas para a forma inorgânica desse elemento, ou seja, o SnCl₂ não é capaz de reduzir espécies orgânicas, como CH₃Hg⁺, à forma elementar [78, 97]. Quando se quer gerar vapor de espécies orgânicas, deve-se usar NaBH₄ como reagente redutor, pois assim é possível a formação de um hidreto volátil conforme mostrado na Equação 9 [78].



Conforme já mencionado anteriormente, o NaBH₄ também é capaz de reduzir Hg²⁺. Sendo assim, com o uso desse reagente, tem-se a possibilidade de avaliar a quantidade total, bem como quantidades fracionadas (especiação)

* Adaptado de Heller e Weber [93].

de Hg. Contudo, a determinação de CH_3Hg^+ a partir da formação de seu hidreto não trata-se de CV AAS, pois para a quebra da ligação e liberação do Hg para a sua forma fundamental é necessário o fornecimento de aquecimento a cela, o que é típico de HG AAS [17, 98].

Para a determinação de Hg total, considerando a técnica de CV AAS, é necessário uma conversão das espécies orgânicas à forma inorgânica antes de serem encaminhados a reação de redução com SnCl_2 [7, 99]. Esse processo de oxidação da matéria orgânica se dá principalmente quando se trata de determinação de Hg em amostras biológicas, o qual pode se dar pelo uso de soluções oxidantes injetadas em linha, como persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), brometo/bromato de potássio (KBr/KBrO_3), permanganato de potássio (KMnO_4) ou dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Além disso, outra alternativa para eliminação da matéria orgânica presente na amostra é o uso de calcinação ou digestão com ácidos oxidantes fortes (como HNO_3), bem como a exposição a radiação UV ou micro-ondas [99, 100].

3.3. Preparo de amostras

A etapa de preparo de amostras é extremamente importante, pois é a partir dela que a amostra é convertida a uma forma adequada para análise, ou seja, garantir que a espécie química de interesse seja determinada [15, 101]. Além disso, essa etapa também é importante para casos em que é preciso concentrar ou diluir as amostras, bem como para separar analitos de um grupo de outros componentes, a fim de evitar interferências no momento da leitura instrumental [102].

Quando se fala em preparo de amostras, deve-se também destacar os procedimentos preliminares, os quais são essenciais para garantir uma maior segurança nas análises químicas. Dentre esses procedimentos, encontram-se a lavagem, secagem, moagem e peneiramento, os quais serão necessários dependendo da natureza da amostra em questão [15].

Considerando as etapas da sequência analítica, o preparo das amostras é responsável por 61 % do tempo total. Além disso, 30 % dos erros de uma análise podem ser atribuídas a essa etapa [101]. Essas evidências

caracterizam tal etapa como a mais crítica, pois a esses erros pode-se associar as possíveis perdas de analitos por volatilização ou adsorção, dissolução incompleta do analito e contaminação, a qual pode advir do ar, reagentes ou materiais em geral. Além disso, a falta de treinamento e desqualificação do analista também pode contribuir com erros associados a essa etapa [15].

Como objetivos dessa etapa, busca-se obter sempre os melhores resultados, no mais curto espaço de tempo, com a mínima contaminação, baixo consumo de reagente e geração de pouco resíduo [15]. Para isso, a literatura reporta diferentes caminhos que podem ser seguidos para o preparo de diferentes tipos de amostras [101, 103]. A Figura 14 apresenta um esquema com alguns desses caminhos, destacando que, para a escolha do método, é fundamental conhecer o estado em que se encontra a amostra e se há necessidade de tratamentos preliminares, tais como lavagem, secagem, moagem ou peneiramento [15].

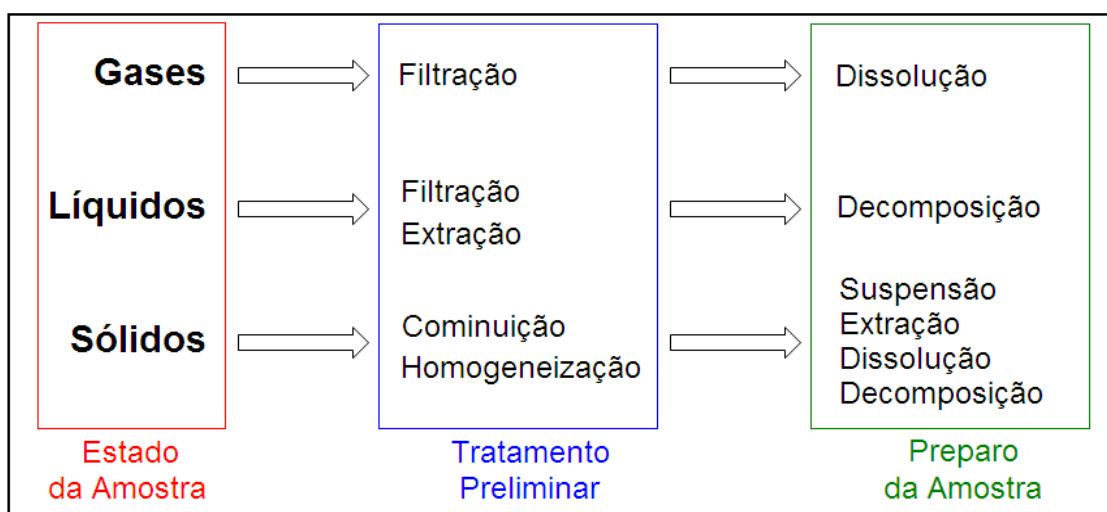


Figura 14 – Diferentes opções que podem ser adotadas para a etapa de preparo de amostras. Adaptado de Krug [15].

Conforme pode ser visualizado na Figura 14, há diferentes formas de se preparar uma amostra. Isso pode levar a um interessante questionamento, que é saber qual é o melhor caminho a seguir, ou seja, o procedimento que alcançará todos os objetivos de uma análise química. Para sanar essa dúvida, alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como conhecer as características do elemento que se quer determinar, as faixas de concentração

desse elemento, a quantidade de amostra disponível, a qualidade do local em que será feito as análises, o custo relacionado, o tempo gasto e a qualificação e/ou experiência do analista que irá manusear as amostras [15]. O fato é que pesquisadores podem se deparar com situações diárias no mínimo preocupantes, pois receber uma amostra desconhecida pode tornar um grande problema para uma análise química. Contudo, cabe a esses pesquisadores desenvolver ou melhorar métodos analíticos com o intuito de atingir os objetivos da análise química em questão.

3.3.1. Métodos para o preparo de amostras biológicas

São crescentes nos últimos anos os estudos para a determinação e controle de elementos químicos (como por exemplo, o Hg) em diferentes tipos de amostras, sejam elas ambientais, biológicas, farmacêuticas, entre outras [9, 15, 104]. Com isso, é de suma importância conhecer o tipo de amostra que será sujeita a procedimentos analíticos, pois assim é possível adotar o melhor método para a sua preparação e minimizar possíveis erros que podem estar associados [102]. Obviamente, o método escolhido para o preparo das amostras deve ser compatível com o método utilizado para a determinação dos analitos em questão [15].

Recentemente, o uso da técnica de análise direta de sólidos vem ganhando destaque na literatura [105], uma vez que mínimas manipulações das amostras são exigidas, o que lhe confere uma menor probabilidade de erros sistemáticos [105, 106]. Entretanto, mesmo sendo mínima, a manipulação das mesmas não é dispensável, pois, por exemplo, se necessita de uma moagem eficiente para alcançar partículas em tamanhos ínfimos para as análises. Além disso, alguns pontos negativos podem ser atribuídos a essa técnica, tais como a imprecisão nos resultados analíticos devido à falta de homogeneidade, pois essa técnica exige pequenas quantidades de amostras, bem como o surgimento de alguns inconvenientes no momento da calibração instrumental, visto que pode tornar-se complexa dependendo da natureza da amostra [105].

Com exceção desta técnica que utiliza análise direta de sólidos, a

maioria dos procedimentos analíticos necessita que a amostra esteja em estado líquido para a introdução em um instrumento de análise [107]. Para isso, um dos métodos mais empregados para esse tratamento é a decomposição, onde os analitos de interesse permanecem solúveis, porém separados da fração orgânica da amostra. Essa decomposição, segundo Flores e colaboradores [107], pode ser dividida em dois grandes grupos, os quais tratam-se da digestão por via úmida e combustão.

O uso de solubilização de amostras, principalmente de natureza biológica, também é reportado na literatura, seja em meio alcalino [108] ou em meio ácido [19]. Contudo, tais procedimentos serão melhores discutidos no segundo capítulo desta dissertação.

3.3.1.1. Decomposição de amostras biológicas

Considerando o processo de decomposição, diferentes métodos podem ser adotados, dependendo do tipo de amostra e a finalidade da análise. Geralmente esses processos envolvem a adição de reagentes e energia, que seja suficiente para romper algumas ligações químicas [15, 101].

Dentre esses procedimentos, a decomposição por via úmida é muito empregada para amostras biológicas, a qual pode se dar tanto em sistema aberto como em sistema fechado [101]. Para ambos os casos, o reagente adicionado às amostras trata-se de um ácido mineral oxidante, uma mistura entre diferentes ácidos ou uma mistura entre ácido e outro reagente (como por exemplo, peróxido de hidrogênio). Com isso a matéria orgânica presente é então oxidada a CO_2 e H_2O , permanecendo os analitos de interesse em solução ácida, na forma de cátions inorgânicos simples [15].

Na decomposição por via úmida em sistema aberto, o aquecimento pode ser realizado por meio de um bloco digestor, chapa de aquecimento, bico de Bunsen ou em forno mufla. Contudo, o grande inconveniente de se utilizar sistemas abertos, principalmente quando se quer determinar Hg, é o risco de perdas do analito e/ou ácido por volatilização, bem como a contaminação da solução da amostra [14, 101, 109]. Outras desvantagens também podem estar associadas, como o longo tempo necessário para a decomposição e o uso de

grandes volumes de ácidos. Isso se dá, principalmente, quando se necessita a reposição desses reagentes devido a sua volatilização em temperaturas elevadas, implicando assim em altos valores de brancos analíticos e, desta forma, comprometendo o LD da análise [15].

Um fator importante para o processo de decomposição em sistemas abertos é a temperatura empregada, a qual vai depender do tipo de amostra a ser preparada. Como exemplo, pode-se citar o estudo realizado recentemente por Nunes e colaboradores [110], os quais utilizaram uma temperatura de 90 °C por uma hora para a decomposição de 0,5 g de amostras alimentícias de carnes com a adição de HNO_3 e H_2O_2 . Entretanto, o grande limitante na escolha da temperatura ideal é a ebulição dos ácidos envolvidos. A Tabela 2 mostra a temperatura de ebulição de alguns ácidos que podem ser utilizados para o preparo de amostras biológicas.

Tabela 2 – Ponto de ebulição de alguns ácidos à pressão atmosférica. Adaptado de Krug [15].

Ácido	Concentração, % (m/m)	Ponto de Ebulição, °C
HNO_3	65-69	121
HCl	37	109
H_2SO_4	98	339
HClO_4	72	203

Com exceção do ácido perclórico (HClO_4), todos esses ácidos podem ser utilizados individualmente para o preparo de amostras. O HClO_4 apresenta essa limitação devido ao risco de explosões violentas quando a quente entra em contato com materiais orgânicos ou com substâncias inorgânicas facilmente oxidáveis. Apesar de ser um poderoso oxidante, o seu uso vem sendo diminuído justamente pelo perigo de sua manipulação [15]. Entretanto, dentre os ácidos citados na Tabela 2, o mais empregado para fins de decomposição em via úmida é o HNO_3 , visto que quase todos os nitratos de metais são solúveis em água. Além disso, trata-se de um ácido eficiente no processo de oxidação de matéria orgânica e de fácil purificação [15, 111]. Por se tratarem de ácidos fortes, cuidados devem ser tomados para a manipulação dos mesmos a

fim de evitar acidentes graves.

Em um sistema aberto com a utilização de apenas HNO_3 como reagente, não é possível obter uma total eficiência de decomposição dependendo do tipo de amostra. Por exemplo, Gonzalez e colaboradores [111] informam que para a decomposição rápida e completa de amostras com alto teor de carboidratos, precisa-se de uma temperatura de $140\text{ }^\circ\text{C}$, enquanto que para altos teores de proteínas e lipídios são necessários 150 e $160\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Em tais temperaturas com certeza teria-se a perda de analito por volatilização se o objetivo fosse a determinação de Hg, pois para se ter uma ideia da dificuldade de se preparar uma amostra com aquecimento para tal finalidade, Krug [15] relata que 81 % do Hg é perdido a $110\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas de aquecimento em amostra de peixe. Esse dado refere-se a um processo de decomposição por via seca, ou seja, a amostra é submetida a um aquecimento em um forno mufla até a queima da fração orgânica e obtenção de um resíduo na forma de cinza, o qual é solúvel em ácido diluído. Apesar desse procedimento, nota-se que a etapa de preparo de amostras para a determinação de elementos voláteis pode ser crítica devido à dificuldade de garantir que a amostra seja decomposta e ao mesmo tempo sem perder os analitos a serem analisados.

Para contornar tais inconvenientes na etapa de preparo das amostras, o uso de decomposição em sistema fechado vem sendo muito explorado, a fim de melhorar a eficiência de digestão e evitar perdas de analitos e/ou reagentes por volatilização [101, 107]. Os primeiros estudos do uso de sistema fechado para o preparo de amostra foram relatados por Carius (1860), onde esse pesquisador utilizou um tubo de vidro selado, no qual fora adicionado a amostra e HNO_3 , sendo posteriormente aquecido a temperaturas elevadas (de 250 a $300\text{ }^\circ\text{C}$) por algumas horas [15, 101]. Nessas condições, a decomposição ácida com HNO_3 se torna muito eficiente devido ao aumento proporcional da temperatura e pressão do sistema [15]. Contudo, devido a esse aumento da pressão interna, aumenta o risco de explosões do sistema, colocando assim em risco as análises, bem como o analista [112].

Com o passar do tempo, novos métodos de decomposição em sistema fechado foram desenvolvidos e/ou aperfeiçoados a fim de alcançar cada vez

mais segurança e eficiência durante o processo. Por exemplo, o sistema desenvolvido por Bernas em 1968 e Tölg em 1972, o qual ficou conhecido como bomba de decomposição, se trata de um frasco de politetrafluoretileno (PTFE) pressurizado e contido em um cilindro de aço que é aquecido convencionalmente em uma chapa de aquecimento [15, 101]. Nesses sistemas fechados, o tempo de decomposição das amostras é reduzido, quando comparado com sistemas convencionais abertos, pois um grande aliado para acelerar o processo é a pressão interna envolvida. Além disso, é possível elevar o ponto de ebulição dos ácidos utilizados, o que pode resultar em excelentes decomposições [113, 114]. Sendo assim, Knapp desenvolveu um sistema, o qual foi publicado em 1984, que opera a altas pressões e temperaturas, podendo chegar a decomposições de até 300 °C apenas utilizando HNO_3 . Nesse sistema, as pressões geradas no interior do frasco contendo a amostra são equilibradas por uma pressão externa utilizando N_2 , o qual pode chegar a 130 bar [15, 101]. Essas condições de decomposição descritas podem levar à obtenção de soluções das amostras com mínima porcentagem de carbono residual, ou seja, o processo de decomposição é de extrema eficiência para a eliminação de toda a matriz da amostra [15, 114]. Além disso, é importante avaliar o teor de carbono para evitar interferências durante o processo de leitura instrumental, uma vez que tal resíduo pode afetar o desempenho de algumas técnicas analíticas [115].

Dentre os métodos que utilizam sistema fechado, recentemente os fornos de micro-ondas vem ganhando destaque no preparo de amostras, devido a sua simplicidade, rapidez e aplicabilidade para diversos tipos de matrizes [101, 103, 116]. O uso da radiação micro-ondas para a decomposição de amostras já é bastante conhecido, tendo os primeiros relatos em 1975, sendo esses estudos realizados em frascos aberto e em fornos domésticos. Com os avanços instrumentais, novos sistemas de micro-ondas foram criados a fim de aperfeiçoar tal prática bem como garantir maior segurança ao operador, uma vez que é possível obter informações de pressão e temperatura interna aos tubos durante o processo de decomposição [15].

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas portadoras de energia, onde uma vez absorvidas provocam um aumento considerável na temperatura

de tal material absorvente. Isso se deve a interação dessa radiação eletromagnética com os íons contidos em solução, provocando assim a migração iônica e rotação de dipolos. Esse aquecimento tem como característica a absorção direta de energia pelo material, ou seja, não ocorre conforme observado no aquecimento convencional (chapas de aquecimento, chamas, etc.) [15, 112].

Com relação à instrumentação, os fornos de micro-ondas contém um magnetron que produz as radiações, as quais são então conduzidas por meio de um guia de onda e dispersadas para o interior do forno. As amostras que estão contidas em tubos são expostas à radiação de forma homogênea, uma vez que esses tubos são distribuídos em uma bandeja rotatória [15]. Além desse sistema convencional de decomposição por micro-ondas, a literatura ainda reporta o uso da radiação focalizada. Tal sistema segue o mesmo princípio de decomposição já descrito, porém apresenta algumas diferenças em termos de instrumentação. Em um sistema de radiação micro-ondas focalizada, a parte superior dos tubos não fica em contato com a cavidade interna do forno e, além disso, um condensador é conectado a esses tubos para fins de condensação dos vapores gerados [15, 117].

Ainda explorando o uso da radiação micro-ondas, a literatura reporta diversos estudos para a determinação de metais e metalóides em amostras decompostas através de combustão iniciada por micro-ondas (MIC) [118, 119]. Tal método foi proposto por Flores e colaboradores [120], o qual consiste, basicamente, na decomposição de amostras em frascos fechados e pressurizados com oxigênio. Após o processo de combustão, os analitos presentes na amostra são absorvidos em uma solução apropriada [15]. De um modo geral, o uso de fornos de micro-ondas para o preparo de amostras apresenta diversas vantagens, as quais algumas já foram citadas anteriormente. Contudo, uma grande desvantagem do uso desses sistemas é o alto custo atribuído aos fornos, fazendo com que nem todos os grupos de pesquisa e laboratórios que fazem análises de rotina tenham acesso [121].

Para casos onde não há acesso a métodos sofisticados para o preparo de amostras, pesquisadores acabam sendo impulsionados para o desenvolvimento de métodos alternativos para tal etapa, a fim de garantir

resultados tão satisfatórios quanto os alcançados em procedimentos já bem estabelecidos na literatura.

3.3.1.2. Uso de dedo frio no preparo de amostras

O uso de condensadores na química já vem sendo explorado durante muitos anos, o qual trata-se de um sistema que promove a mudança de fase vapor para a líquida. Além de ser muito utilizado para a destilação de líquidos em processos de purificação, em química orgânica pode ser também empregado na realização de reações, a fim de garantir que o solvente ou algum outro componente presente não seja perdido. Para esse fim, o processo de refluxo auxilia na homogeneização e também acelera a reação química [122].

Para a etapa de preparo de amostras, principalmente em processos de decomposição ácida, o uso de sistemas com dedo frio torna-se muito atrativa, justamente por possuir uma superfície mais fria, a qual é resfriada com água, garantindo assim uma eficiente condensação dos vapores gerados no interior do tubo. Isso garante uma melhor eficiência durante o processo, pois é possível aproveitar ao máximo a capacidade de decomposição dos ácidos. Essa aplicação é bastante conhecida, pois em 1972 um estudo de revisão foi realizado por Tölg [123], no qual é relatado o uso de um sistema com dedo frio para o processo de decomposição de amostras. O autor divulga em seu estudo o desenho do sistema para a combustão de amostras, onde o dedo frio apresenta orifícios para entrada e saída de água fria, mantendo assim uma circulação de água e garantindo um ambiente sempre frio, além de contar com uma abertura central para entrada de oxigênio e outra para o vácuo, facilitando assim o processo de combustão das amostras depositadas no interior do tubo. Esse sistema foi então muito utilizado para a determinação de elementos a nível traço em diversas matrizes de origem orgânica [123].

A ideia de se utilizar sistemas para proporcionar refluxo no preparo de amostras foi sendo explorada de acordo com os anos, pois, em 1991, Nieuwenhuize e Poley-Vos [124] relatam um método de extração com o uso de uma mistura ácida HCl/HNO_3 (3:1 – água régia) e um sistema de frascos de

digestão adaptados com condensadores para a determinação de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn em amostras de solo, sedimento e lodo por técnicas de espectrometria atômica (F AAS, GF AAS e ICP OES). Os resultados obtidos foram comparados com outro método, o qual utiliza extração com forno de micro-ondas, onde, segundo os autores, não houve diferenças significativas para os estudos avaliados. Condensadores para refluxo também foram utilizados por Saraswati e colaboradores, onde esses autores utilizaram uma mistura ácida entre HNO_3 , H_2SO_4 e HClO_4 para a decomposição de amostras e posterior determinação de As e Se em CRMs de folhas de tomate e espinafre [125] e em lodo [126] por FI-HG-AAS. Além desses dois analitos, esses autores ainda ampliaram os estudos para a determinação de mais um elemento, o qual trata-se de Hg em amostras de sedimentos por FI-CV AAS [127].

O uso de sistemas de refluxo vem sendo explorado com sucesso para o controle de metais em diferentes tipos de amostras. Contudo, é possível verificar em muitos trabalhos recentes que os condensadores habituais estão sendo substituídos por sistemas com dedo frio, os quais tratam-se de um tubo de vidro que fica conectado a parte superior dos frascos de digestão, caracterizando-se assim como uma superfície fria devido a este conter água para arrefecer os vapores internos gerados. Como aplicação de tais sistemas recentemente, Ferreira e colaboradores [128] desenvolveram uma metodologia analítica para a determinação de Cd em amostras de vinhos por GF AAS. Nesse estudo, os autores utilizaram 5 mL de amostra, 10 gotas de HNO_3 e 2 mL de H_2O_2 para o processo de decomposição, o qual ocorreu em um sistema com dedo frio e aquecido por meio de um bloco digestor. Esse mesmo analito também foi determinado em amostras de arroz, onde Silva e colaboradores [129] utilizaram a técnica de GF AAS para detecção após as amostras serem decompostas utilizando o sistema com dedo frio. Para esse procedimento, os autores utilizaram 2 mL de HNO_3 e 1 mL de H_2O_2 para decompor 0,5 g de amostra por 2 horas à 120 °C.

Em outro estudo, Nano e colaboradores [130] utilizaram o sistema com dedo frio e bloco digestor para a decomposição de amostra certificada de tecido de ostra. Tal procedimento foi realizado com a adição de 5 mL de uma mistura contendo HNO_3 , HCl e H_2O_2 , em diferentes proporções, e a posterior

determinação de Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, V e Zn por ICP OES. A determinação de As também fora realizado por outros autores, os quais também utilizaram um sistema semelhante para a decomposição, mas diferem no tipo de amostra analisada, bem como na técnica adotada para a detecção desse analito. Em tais estudos, foi então possível a determinação de As em material particulado atmosférico [131], em fertilizantes e rochas [132], ambos por HG AAS, e em gasolina por HG-GF AAS [133].

Para a determinação de Pb em amostras de alimentos vegetais, Jesus e colaboradores [134] também descrevem o uso do sistema com dedo frio e bloco digestor para o preparo das amostras. Nesse estudo, os autores utilizaram uma mistura entre HNO_3 e H_2O_2 para o processo de decomposição, obtendo posteriormente os resultados analíticos através da técnica de GF AAS. Semelhantemente a esse procedimento, Dessuy e colaboradores [135] determinaram Cd e Pb em bebidas. Contudo, assim como nos demais estudos citados, não há maiores informações sobre o projeto desenvolvido, bem como algum estudo mostrando a eficiência e/ou limitações do sistema.

Como já mencionado, é possível notar artigos recentes explorando o sistema com dedo frio. Essa alternativa para o preparo de amostra pode então ser empregada para outros tipos de amostras, bem como para a determinação de elementos que apresentam certas dificuldades nessa etapa, como por exemplo, os elementos mais voláteis. Alguns desses elementos já se mostraram passíveis de serem quantificação, tais como As, Cd e Pb, apresentando resultados satisfatórios e comprovando a eficiência do sistema de dedo frio.

Para o Hg, que é o elemento mais volátil e capaz de proporcionar maiores chances de erros na etapa de preparo, há estudos que foram desenvolvidos por Silva-Filho e colaboradores [136], que além desse elemento também fizeram a determinação de Fe, Mn e Zn em amostras de sedimentos. Nesse estudo, especificamente para Hg, os autores utilizaram um reator térmico-cinético com dedo frio para o processo de decomposição, o qual se deu com a utilização de uma mistura ácida (água régia) aquecida a 70 °C por uma hora. As determinações desse elemento foram realizadas através de CV AAS e obtendo resultados concordantes, visto que os autores utilizaram

amostras de referência certificada (CRM) para a validação da metodologia. Maiores detalhes ou uma ilustração do reator com dedo frio não foram apresentados também nesse artigo.

No segundo semestre de 2012, Ferreira e colaboradores [137] publicaram um trabalho de revisão sobre o emprego de sistemas com dedo frio no preparo de amostras e determinação de voláteis. Esse autor tem participação na maioria dos artigos recentes envolvendo tal sistema, mas até então nenhum desenho esquemático havia sido divulgado. Com o trabalho de revisão foi possível conhecer o dedo frio empregado no preparo de amostras, o qual encontra-se representado na Figura 15.

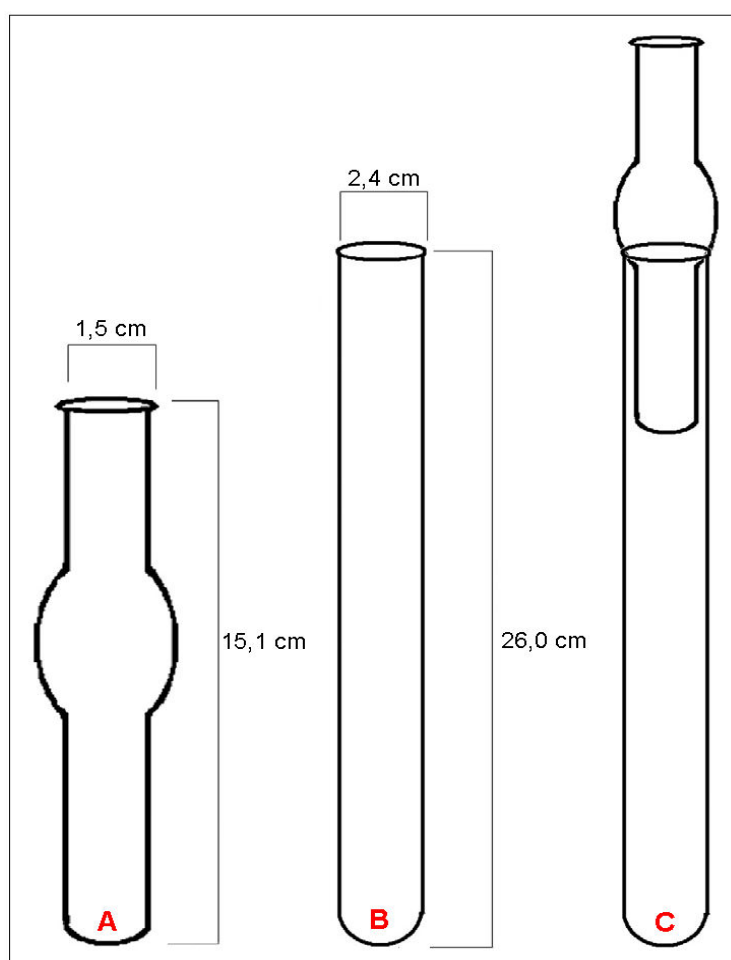


Figura 15 – Desenho esquemático de (A) dedo frio, (B) tubo de digestão e (C) sistema de digestão com dedo frio. Adaptado de Ferreira e colaboradores [137].

Segundo os autores, o tubo apresentado na Figura 15A tem capacidade de volume de 40 mL, tornando-se assim um dedo frio, o qual é conectado aos

frascos de digestão que tem capacidade máxima de 90 mL. Além dessas informações, os autores relatam nesta revisão diversas aplicações recentes, mostrando que trata-se de um campo promissor dentro da etapa de preparo de amostras, por ser ainda muito pouco explorado [137]. Contudo, com uma observação detalhada desse sistema apresentado, alguns pontos chamam atenção: o dedo frio não permite um refluxo contínuo de água, o que ao longo do tempo pode aumentar a temperatura e se tornar um recipiente com água em um estado indesejável, ou seja, um “dedo morno”; a condensação pode acumular nos contatos superiores e escorrer pela lateral do tubo; o alívio de pressão pode ocasionar saltos no dedo e dependendo do nível de água, pode projetar para fora desse recipiente. Ou seja, embora simples pode não ser prático e a eficiência pode se reduzir principalmente nos métodos que necessitam de elevados tempos e temperatura para uma digestão. Esses pontos observados chamam atenção e faz refletir no desenvolvimento de um novo desenho para o dedo frio, para que fosse possível contornar estes inconvenientes e de fácil adaptação nos tubos comerciais de digestão. Assim, o capítulo 1 desta dissertação é fruto deste trabalho.

4. Materiais e Métodos

4.1. Instrumentação

A realização de todas as medidas se deu em um espectrômetro de absorção atômica modelo AA-6300 (Shimadzu, Japão), o qual foi equipado com uma lâmpada de cátodo oco de Hg (Hamamatsu photonics K. K., Japão) e uma lâmpada de arco de deutério como corretor de fundo. As condições de operação do espectrômetro estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições operacionais do AAS.

Parâmetro	Condição
Comprimento de onda (nm)	253,7
Fenda espectral (nm)	0,7
Corrente da lâmpada (mA)	4,0

Um atomizador de tubo de quartzo (QTA), com dimensões de 14,7 cm de comprimento e 2,4 cm de diâmetro, foi posicionado sobre o compartimento da chama, ficando assim no caminho ótico do espectrômetro e mantido a temperatura ambiente. Para as medidas de absorvância, foram selecionados gráficos em modo contínuo em altura de pico.

Um gerador de hidretos HVG-1 (Shimadzu, Japão), operado de forma manualmente, foi acoplado ao espectrômetro. Como condições de operação, foi utilizado uma solução de 0,5 % m/v de SnCl_2 em 3,0 % (v/v) de HCl como reagente redutor e outra solução de 4,0 % (v/v) de HCl como meio transportador. As amostras foram injetadas no sistema utilizando modo de fluxo contínuo, a uma velocidade de rotação da bomba peristáltica de 70 rpm, o que corresponde a uma vazão de $6,2 \text{ mL min}^{-1}$ devido ao Tygon[®] de coloração laranja/roxo/laranja com diâmetro interno de 2,62 mm. Uma vazão de 70 mL min^{-1} de gás Argônio, com uma pureza de 99,996 % (Linde, Barueri, SP, Brasil), foi selecionada para transportar as espécies voláteis, advindas do separador gás/líquido (GLS), diretamente para o QTA. Na Figura 16 pode-se observar o sistema utilizado no presente estudo.

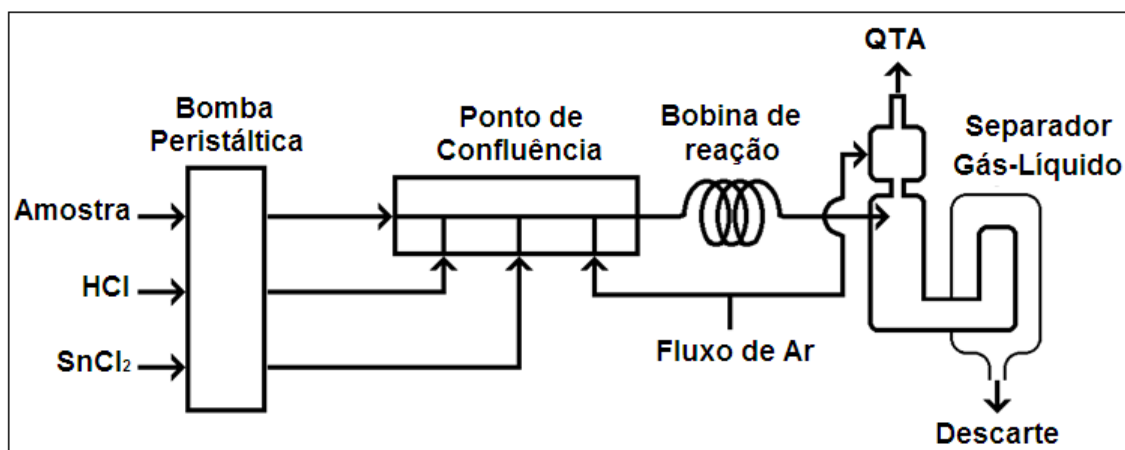


Figura 16 – Esquema do sistema de geração de vapor frio (CV AAS) utilizado para a determinação de Hg.

Para o processo de decomposição ácida, foi utilizado um bloco digestor modelo MA-4025 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Aos tubos de digestão, foi introduzido o dedo frio, o qual consiste em um sistema com circulação interna de água na temperatura ambiente, o qual é adaptado aos tubos por intermédio de um encaixe de teflon que contém uma ranhura lateral para alívio de pressão, fazendo com que o sistema opere em pressão atmosférica. Esse processo de circulação de água é um dos principais pontos que diferencia esse sistema em relação àquele apresentado por Ferreira e colaboradores [137], o que garante que a superfície do dedo continue sempre fria e sem risco de aquecimento da água contida no dedo, o que poderia comprometer o processo de refluxo. O desenho desse sistema foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, cujo esquema está apresentado na Figura 17.

Outro sistema de dedo frio também foi utilizado no estudo, o qual opera pelo mesmo princípio do sistema descrito anteriormente. Porém, nesse é possível introduzir um termômetro para verificação da temperatura da solução ácida, bem como da parede do frasco durante o processo de decomposição das amostras. Esse sistema também foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e um esquema está disposto na Figura 18.

Para avaliar a eficiência do processo de decomposição ácida, um analisador de carbono orgânico total TOC-5000 (Shimadzu GmbH, Duisburg, Alemanha) foi utilizado para a determinação do teor de carbono residual nas soluções das amostras, após essas serem submetidas ao processo de preparo

com e sem o sistema de dedo frio.

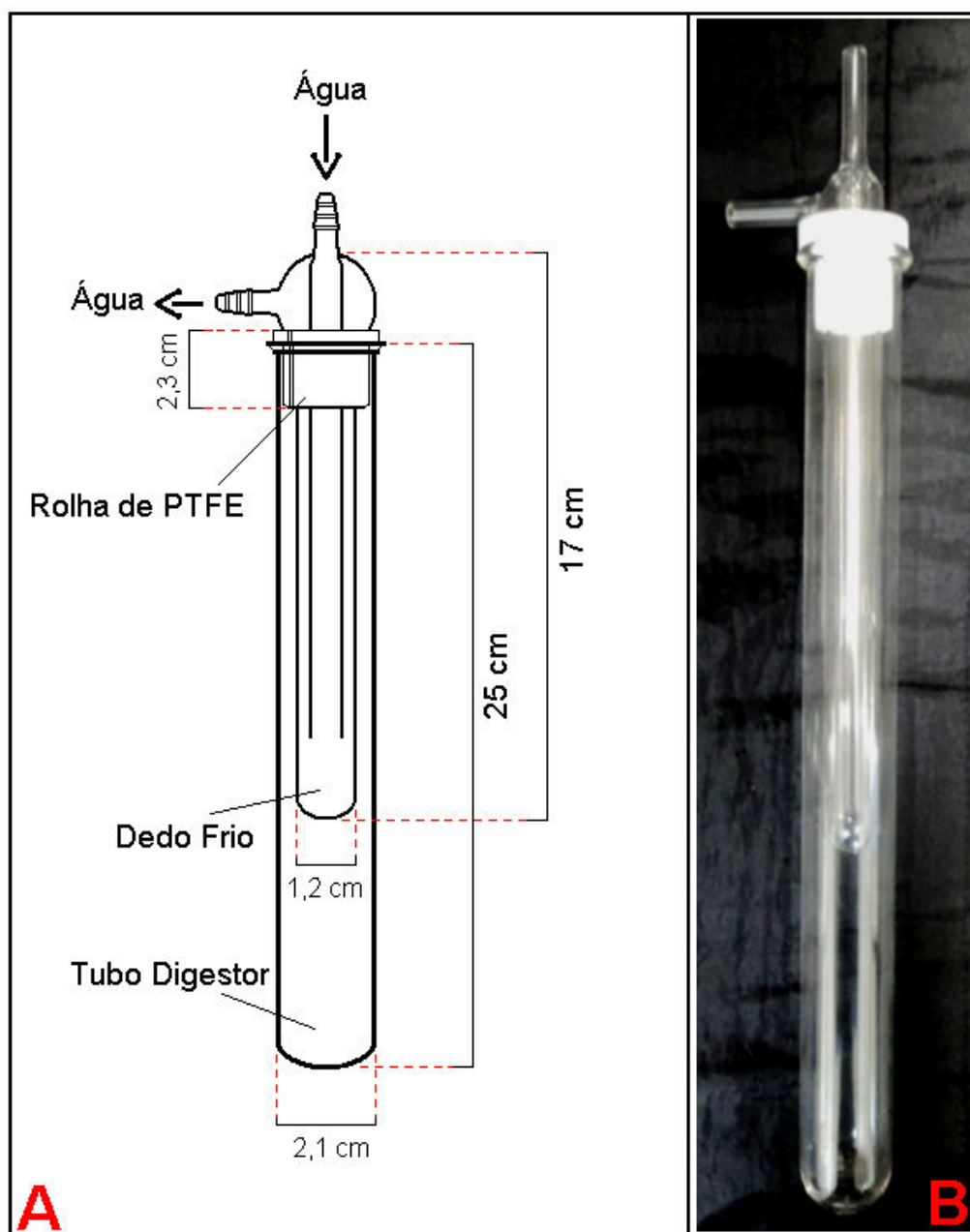


Figura 17 – Sistema de dedo frio utilizado no processo de decomposição ácida. (A) Diagrama esquemático e (B) Figura ilustrativa.

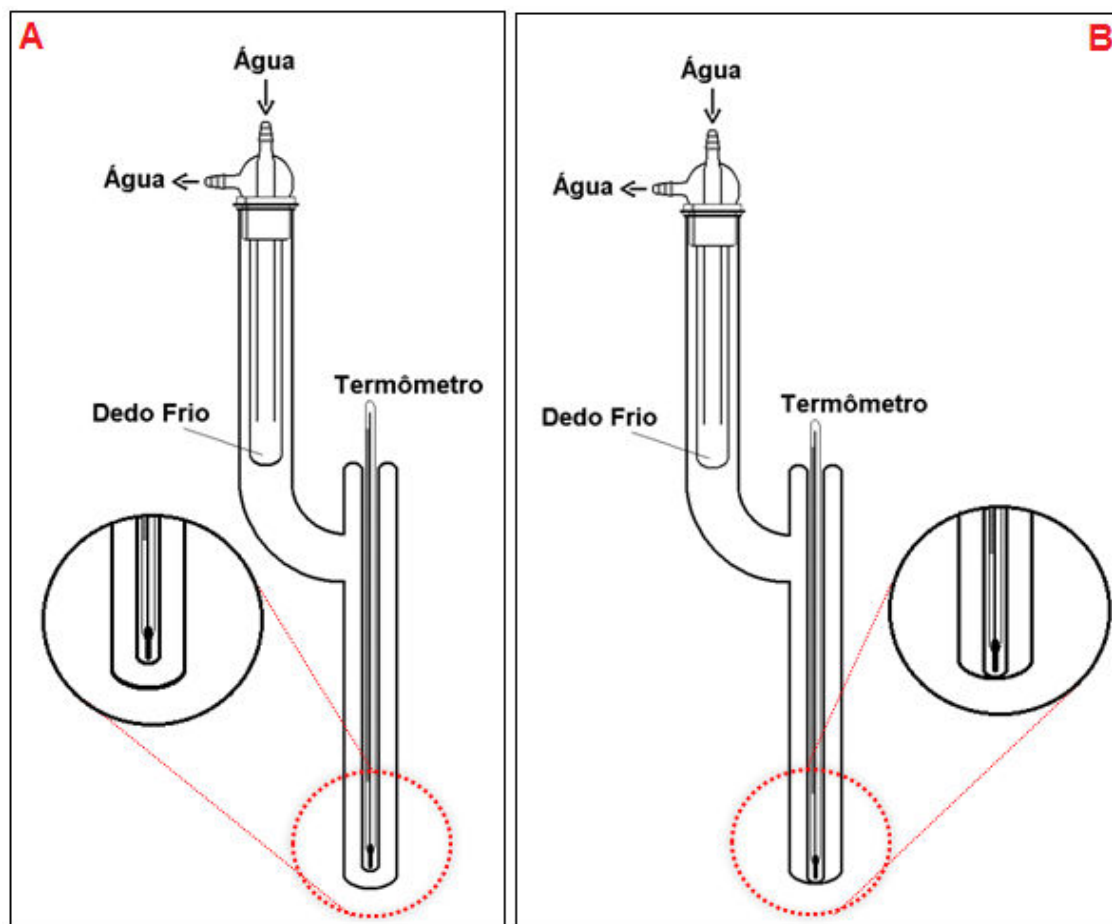


Figura 18 – Sistema de dedo frio utilizado para verificação da temperatura da (A) solução ácida da amostras e da (B) parede do frasco de decomposição.

4.2. Reagentes e Amostras

Os reagentes empregados no estudo foram de grau analítico e todas as soluções utilizadas foram preparadas com água de alta pureza, tratada em um sistema Direct-Q 3 de purificação (Millipore Corporation, Bedford, USA), com resistividade de 18,3 MΩ cm. Para a forma inorgânica de Hg, uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de Hg²⁺ foi preparada pela diluição adequada de uma solução Titrisol (Merck, Darmstadt, Alemanha) em meio de HNO₃ 0,5 % (v/v). Soluções de espécies orgânicas de Hg foram obtidas de forma similar, onde 1000 mg L⁻¹ de CH₃Hg⁺ e 400 mg L⁻¹ de C₂H₅Hg⁺ foram preparadas pela dissolução do sal de cloreto de metilmercúrio (Fluka Analytical, Steinheim, Alemanha) e cloreto de etilmercúrio (Analytical Supelco, Bellefonte, USA), respectivamente, em etanol bidestilado. Os ácidos utilizados, como HNO₃

(Vetec, RJ, Brasil) no preparo das amostras e HCl (Synth, SP, Brasil) no sistema de geração de vapor, foram bidestilados abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). O reagente redutor empregado no sistema de CV AAS foi o SnCl_2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Após o processo de decomposição ácida das amostras, as soluções resultantes foram tituladas com uma solução padronizada $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (Synth, SP, Brasil).

Todos os frascos de polipropileno (PP), utilizados para o preparo das amostras e padrões, bem como as vidrarias e materiais de laboratórios foram lavados com água e sabão, sendo posteriormente imersos em uma solução de HNO_3 10 % (v/v) durante 48 horas. Após esse período, todos os materiais foram enxaguados com água de alta pureza e secos antes do seu uso.

Para avaliar a precisão e exatidão da metodologia desenvolvida utilizando o sistema com dedo frio, os seguintes materiais de referência certificados (CRMs) foram utilizados: DOLT-4 (fígado de peixe), DORM-3 (proteína de peixe) e TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), produzidos pelo National Research Council (NRC, Canada). Todas essas amostras foram pesadas utilizando um balança analítica Ohaus Adventurer modelo AR 2140 (Pine Brook, NJ, EUA) com uma resolução de 0,1 mg e tara máxima de 210 g.

4.3. Preparo das amostras e soluções de calibração

As amostras foram preparadas por meio de uma digestão ácida com e sem o uso de sistema com dedo frio. Para isso, aproximadamente 100 mg (DOLT-4) ou 250 mg (DORM-3 e TORT-2) das amostras biológicas foram pesadas diretamente em tubos digestores, no qual foi adicionado posteriormente 2 mL de HNO_3 concentrado. Essa mistura foi inicialmente aquecida a 50°C , mas essa temperatura foi aumentada lentamente até alcançar 90 , 120 ou 150°C , na qual permaneceu por 2 horas. Após esse processo, os tubos foram resfriados até a temperatura ambiente e as soluções foram transferidas para frascos volumétrico de PP, tendo um volume final de 30 mL (TORT-2 e DORM-3) ou 40 mL (DOLT-4) completado com água ultra pura. A Figura 19 ilustra o processo de decomposição ácida utilizando o sistema com

dedo frio e bloco digestor.



Figura 19 – Processo de decomposição ácida utilizando sistema com dedo frio.

Para avaliar o efeito da temperatura do processo de decomposição das amostras em função da concentração, soluções padrões dos analitos estudados, em uma concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, foram preparadas de forma semelhante à descrita para as amostras, porém submetidas a temperaturas de 80, 100, 120, 140 e 160 °C de aquecimento no bloco digestor por 2 horas, utilizando sistema aberto convencional e sistema com dedo frio. Após esse processo, as soluções resultantes foram transferidas para frascos volumétricos de 50 mL e volume final completado com água ultra pura. Para a etapa de leitura instrumental, essas soluções foram diluídas a uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, a qual trata-se da concentração média da faixa linear adotada.

As soluções de calibração foram preparadas em meio aquoso, a partir da diluição da solução estoque de Hg^{2+} , em uma faixa linear de 2,5 a $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Efeito da temperatura de preparo de amostra

O efeito da temperatura na decomposição de amostras biológicas foi estudado, a fim de avaliar a eficiência do sistema de dedo frio (Figura 17) quando comparado com o sistema convencional aberto em decompor as amostras sem risco de perdas do analito e ácido por volatilização para a determinação de Hg. Os gráficos na Figura 20 representam esse estudo, o qual foi realizado utilizando padrões aquosos da espécie inorgânica e da espécie orgânica, diluídos a uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

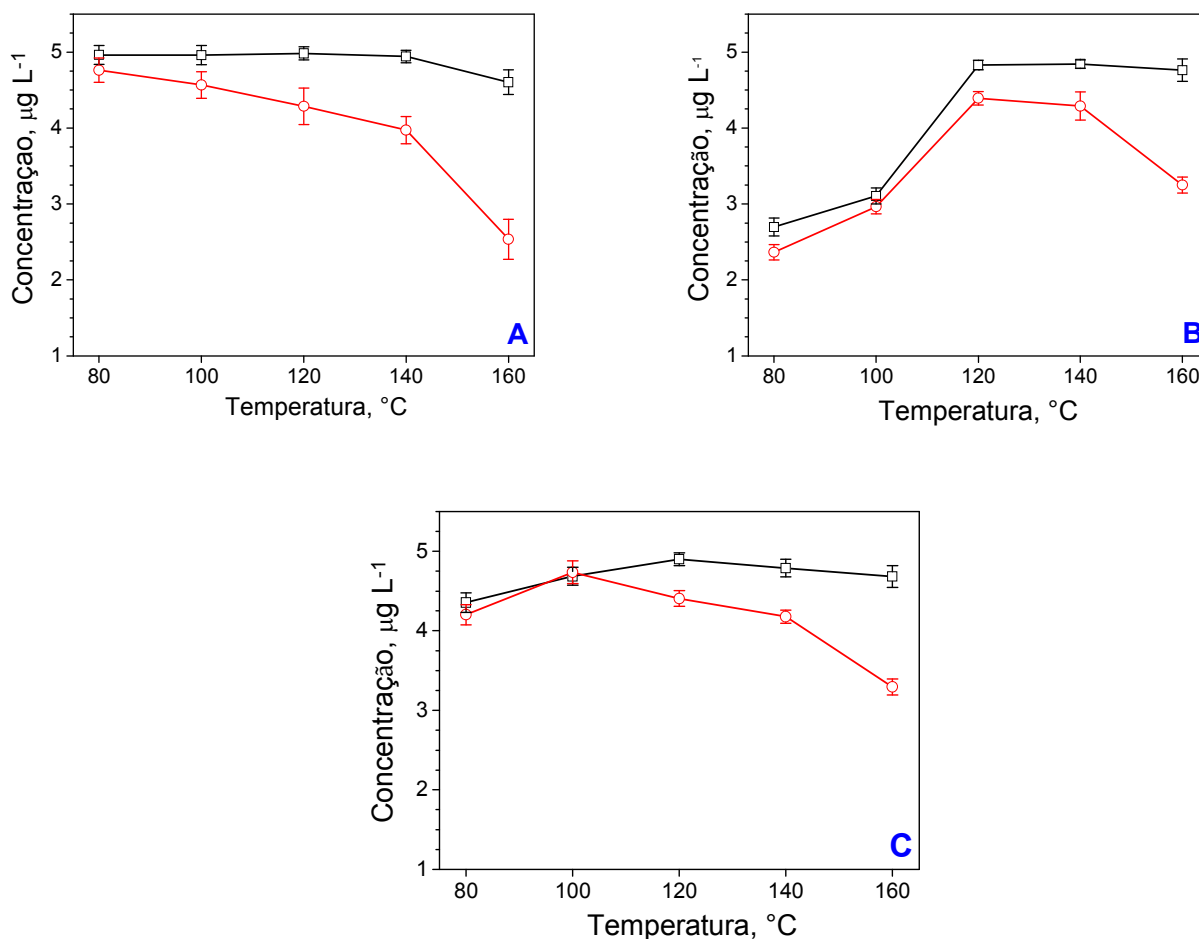


Figura 20 – Efeito da temperatura no processo de decomposição de soluções contendo padrões de (A) Hg^{2+} , (B) CH_3Hg^+ e (C) $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ a uma concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Tais digestões foram realizadas em (—○—) sistema convencional aberto e em (—□—) sistema contendo dedo frio.

Com base no gráfico A da Figura 20, é perceptível, para a espécie de Hg^{2+} , que à medida que a temperatura é aumentada, há uma queda significativa na concentração do analito quando se utiliza o sistema aberto convencional de decomposição. Esse comportamento já não é observado no sistema quando se utiliza o dedo frio, pois é possível notar um valor constante de concentração para as temperaturas de até 140 °C e apenas a 160 °C uma pequena perda é observada, mostrando assim que os riscos de perdas por volatilização são minimizados e/ou eliminados com o uso desse sistema. Na temperatura de ebulição do ácido nítrico (~120 °C), a diferença na concentração obtida entre os sistemas estudados foi de, aproximadamente, 14 %.

Amostras biológicas contêm uma grande parcela de espécies orgânicas de Hg, principalmente em peixes, o que justifica a necessidade de estudos com esses analitos para o preparo de amostras. No gráfico B da Figura 20, o qual representa estudos com CH_3Hg^+ , nota-se que, na menor temperatura de digestão utilizada no tempo proposto (2 horas), o valor de concentração apresentado foi relativamente baixo para esse analito. Conforme a temperatura do bloco foi aumentada até 120 °C, essa concentração cresceu em ambos os sistemas utilizados. Isso mostra que em uma temperatura baixa com um tempo relativamente curto de digestão, não é efetiva a total conversão da espécie orgânica de Hg para a sua forma inorgânica. Sendo assim, é necessária uma maior temperatura de digestão para a determinação de Hg total, o que torna inviável para um sistema convencional aberto, devido à alta volatilidade deste elemento, reproduzindo as tendências de perdas observadas no gráfico anterior para as temperaturas superiores a 100 °C. O gráfico C representa o estudo realizado para $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, o qual o comportamento é semelhante ao discutido para o CH_3Hg^+ , mostrando uma melhor eficiência do sistema de dedo-frio na temperatura de 120 °C. Essa observação já havia sido feita por Sadiq e Zaidi [138], os quais relataram que um tempo de 4 a 6 horas, utilizando uma mistura ácida entre $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ e uma temperatura de 80 °C, é suficiente para a decomposição de amostras de tecido de peixe e determinação de Hg. Com essa mesma temperatura e um tempo de 2 horas, os autores obtiveram valores inferiores para a concentração de Hg após o processo de

decomposição. Com relação a decomposição de amostras biológicas utilizando apenas HNO_3 como meio oxidante, Adeloju e colaboradores [139] mostraram recuperações menores do que 50 % para a forma orgânica de Hg, quando utilizada uma temperatura de 90 °C e um tempo de 90 minutos. Entretanto, recuperações próximas de 100 % foram atingidas para a determinação de Hg inorgânico. Com isso, os autores afirmam que a conversão de todo o Hg para a sua forma inorgânica é influenciada pela natureza da amostra, bem como pelas condições de decomposição ácida empregada.

O sistema com dedo frio utilizado é operado a pressão atmosférica, sendo um sistema semifechado, o que dificulta a contaminação pelo meio externa. Um estudo para verificar a temperatura da solução e do frasco reacional foi realizado com o sistema de dedo frio apresentado na Figura 18 e utilizando uma temperatura superior (150 °C) ao ponto de ebulição do HNO_3 . Sendo assim foi possível perceber que durante todo o tempo adotado para o processo de decomposição, a temperatura não ultrapassou os 120 °C, conforme pode ser visualizado na Figura 21.

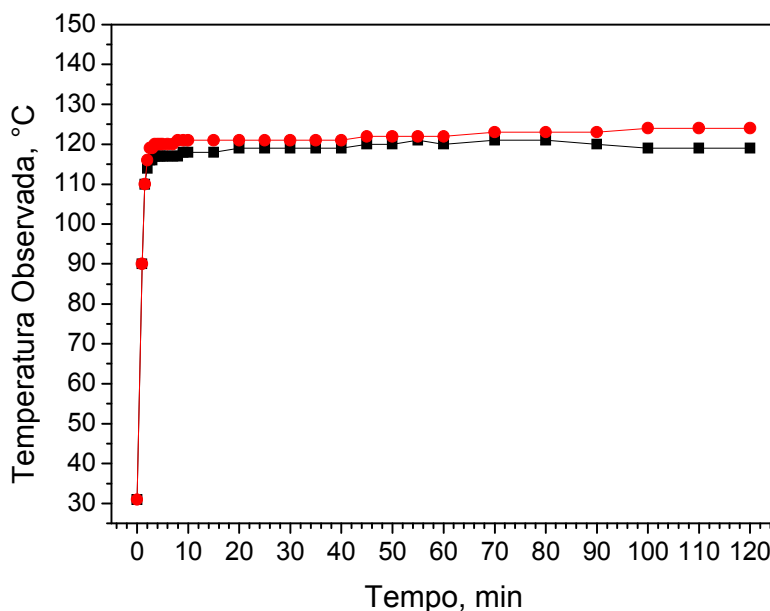


Figura 21 – Temperatura atingida ao longo do tempo para o processo de decomposição da amostra TORT-2 utilizando HNO_3 e uma temperatura de 150 °C selecionada no bloco digestor. Temperatura observada para a solução da amostra (-■-) e para a parede do tudo digestor (-●-).

O estudo apresentado na Figura 21 foi realizado com a elevação de apenas 30 °C do ponto de ebulição do ácido empregado. Esse estudo pode não ter o mesmo comportamento quando o processo de decomposição ácida for operado em temperaturas muito superiores, uma vez que a parede do frasco pode registrar uma diferença maior de temperatura quando comparado com a solução. Tal procedimento também foi realizado para prever se a solução reacional não apresentava propriedade coligativa de ebulioscopia, ou seja, um aumento no ponto de ebulição da solução ácida devido a presença de outra substância, que no caso trata-se da amostra.

O emprego de temperaturas elevadas do bloco digestor, superiores ao ponto de ebulição do ácido, só é possível utilizando o sistema com dedo frio, uma vez que esse sistema minimiza perdas do ácido por volatilização. Em contrapartida, se o sistema convencional aberto for adotado com temperaturas elevadas, a tendência é chegar a secura do tubo digestor, ou seja, volatilizar a solução ácida presente. Isso pôde ser avaliado com uma titulação ácido/base das soluções das três amostras, resultantes do processo de decomposição ácida a 150 °C em ambos os sistemas utilizados (dedo frio e convencional aberto). Esse processo foi conduzido utilizando uma solução padronizada de NaOH 0,1 mol L⁻¹ como titulante e uma solução de fenolftaleína 1 % (m/v) como indicador, no qual foi possível perceber que o sistema com dedo frio apresentou em média uma concentração de H⁺ de 0,6748 mol L⁻¹, sendo portanto superior a encontrada para o sistema convencional aberto, que foi de 0,5530 mol L⁻¹. Assim, é possível provar que as perdas de ácido por volatilização são minimizadas com o sistema de dedo frio, uma vez que houve uma diferença de 18 % entre as concentrações ácidas encontradas.

Com relação à eficiência de decomposição, pode-se afirmar que as soluções das amostras apresentaram uma pequena diferença no teor de carbono residual, uma vez que foram obtidas concentrações médias de 20,8 e 15,4 % (m/m) para as decomposições utilizando sistema com dedo frio e convencional aberto, respectivamente. Contudo, independente dessa concentração, o uso do sistema com dedo frio garantiu alcançar a total conversão das espécies de Hg para a sua forma inorgânica na temperatura de 120 °C. Em contrapartida, apesar de uma menor concentração de carbono

residual, o sistema convencional aberto é inseguro no processo de decomposição, pois tanto o analito quanto o ácido podem ser volatilizados a essa temperatura.

Os baixos teores de carbono residual indicam uma maior eficiência no processo de digestão das amostras e os resultados obtidos foram discordantes com os dados obtidos para a conversão do mercúrio orgânico para a forma inorgânica. Assim é possível concluir que o dedo frio além de impedir as perdas de Hg e ácido, evitou também as perdas por volatilização dos compostos de carbono produzidos durante as mineralizações das amostras. Além disso, embora a temperatura observada na solução reacional não ultrapassar o ponto de ebulição do ácido, a elevação da temperatura de aquecimento do bloco digestor proporcionou uma melhor eficiência no processo de decomposição, o que se deve certamente a efeitos cinéticos provocados por uma maior turbulência durante a digestão.

5.2. Parâmetros de mérito

Para a determinação de Hg em amostras biológicas, curvas de calibração em meio aquoso foram construídas em uma faixa linear de 2,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, pela qual foi possível obter um coeficiente angular de 0,025 $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$ e um coeficiente de correlação linear de 0,9998. Com relação ao LD_M e LQ_M , foram alcançados valores de 14 e 44 ng g^{-1} , respectivamente.

De acordo com a comissão de regulação da EU [56] e a ANVISA [57], o limite máximo para Hg em amostras de peixe é de 1 mg Kg^{-1} . Esse valor é muito superior ao LQ encontrado para a metodologia desenvolvida e proposta, pois uma vez convertida as unidades, o valor de LQ equivale a 0,044 mg Kg^{-1} . Sendo assim, é possível assegurar que tal metodologia é eficaz para o controle desse elemento em amostras de origem marinha.

5.3. Determinação de Hg total em amostras biológicas

Para verificar a eficiência do sistema de digestão proposto, CRMs de amostras biológicas foram avaliados para a determinação de Hg total. Essas

amostras foram também preparadas utilizando o sistema aberto convencional em temperaturas de 90, 120 e 150 °C, obtendo os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados analíticos para a determinação de Hg total por CV AAS em CRMs após decomposição ácida em sistemas abertos convencional e com uso do dedo frio, ($n = 3$).

Amostra	VC (mg Kg ⁻¹)	VE, $\bar{x} \pm SD$, mg Kg ⁻¹	VE, $\bar{x} \pm SD$, mg Kg ⁻¹
		(RSD, %)	(RSD, %)
		Sistema Aberto	Sistema dedo frio
Temperatura de 90 °C			
DOLT 4	2,58 ± 0,22	1,28 ± 0,12 (9,4)	1,42 ± 0,06 (4,2)
TORT 2	0,27 ± 0,06	0,18 ± 0,01 (5,6)	0,17 ± 0,01 (5,9)
DORM 3	0,382 ± 0,060	0,215 ± 0,024 (11,2)	0,180 ± 0,016 (8,9)
Temperatura de 120 °C			
DOLT 4	2,58 ± 0,22	1,88 ± 0,20 (10,6)	2,37 ± 0,02 (0,8)
TORT 2	0,27 ± 0,06	0,21 ± 0,02 (9,5)	0,25 ± 0,02 (8,0)
DORM 3	0,382 ± 0,060	0,324 ± 0,040 (12,3)	0,342 ± 0,014 (4,1)
Temperatura de 150 °C			
DOLT 4	2,58 ± 0,22	0,91 ± 0,13 (14,3)	2,36 ± 0,19 (8,0)
TORT 2	0,27 ± 0,06	0,20 ± 0,01 (5,0)	0,23 ± 0,01 (4,3)
DORM 3	0,382 ± 0,060	0,222 ± 0,014 (6,3)	0,309 ± 0,021 (6,8)

VC = Valor certificado; VE = Valor encontrado.

De acordo com a Tabela 4, para uma temperatura de 90 °C os resultados para a concentração de Hg total em todas as amostras foram inferiores ao valor de referência, certamente devido à conversão incompleta de CH₃Hg⁺ a Hg²⁺ em ambos os sistemas de decomposição utilizados. Esse comportamento não foi observado a uma temperatura de 120 °C e utilizando o sistema com dedo frio, uma vez que foi possível alcançar resultados concordantes com o esperado para todos os CRMs. Entretanto, quando se utilizou o sistema convencional aberto a essa temperatura, foram obtidos valores inferiores quando comparado com o sistema de decomposição proposto, apesar da amostra TORT-2 e DORM-3 ainda serem aceitáveis

perante o desvio informado nos valores de referência. Para a amostra DOLT-4, a diferença entre as concentrações de Hg total para ambos os sistemas é considerável, visto que os resultados obtidos pelo sistema convencional aberto foram inferiores ao valor de referência esperado, certamente ocasionadas por perdas por volatilização, ficando ainda mais evidente ainda para a temperatura de 150 °C, onde somente o sistema com uso do dedo frio propiciou a obtenção de resultados exatos. Apesar do estudo mostrado na Figura 21 comprovar que a temperatura no interior do tubo digestor não ultrapassa os 120 °C, é possível concluir que, à medida que a temperatura do bloco digestor for aumentada, a taxa de refluxo dos vapores gerados também tende a aumentar. Com isso, o sistema com dedo frio é capaz de garantir uma maior segurança para a determinação de elementos voláteis, uma vez que foram registrados mínimas perdas de analito a uma temperatura do bloco digestor de 150 °C.

Em comparação entre as temperaturas estudadas nas decomposições das amostras, as soluções ácidas resultantes apresentaram como característica uma coloração mais clara nas maiores temperaturas, o que justifica a possível melhoria na digestão da matéria orgânica e liberação de todo o Hg para a sua forma inorgânica. Com isso, é notável que o processo de decomposição a 120 °C é ideal para a determinação de Hg em amostras biológicas de peixe, o qual só é possível utilizando o sistema com dedo frio, uma vez que este mostrou eficiência e segurança em minimizar perdas desse elemento por volatilização, mesmo em temperaturas de aquecimentos mais elevadas. Essas condições proporcionaram recuperações de, aproximadamente, 91 % para todas as amostras estudadas, o que representa ótimos valores em comparação com o sistema aberto sem o sistema de refluxo.

Com relação aos resultados obtidos através do sistema com dedo frio, foi aplicado um teste estatístico t pareado a um nível de confiança de 95 % para as amostras decompostas a 120 °C. Através desse teste, foi constatado que não há diferenças significativas entre os valores encontrados, mostrando assim a exatidão da metodologia desenvolvida. Além disso, os resultados para esse sistema mostraram também ser precisos de um modo geral, uma vez que a média entre o RSD foi de 5,7 e 9,4 % para o sistema com dedo frio e convencional aberto, respectivamente.

6. Considerações Finais

O sistema de decomposição ácida com dedo frio foi comparado com o sistema convencional aberto, em termos de eficiência, segurança, precisão e exatidão. A temperatura de 120 °C mostrou melhor eficiência em converter as espécies orgânicas de Hg para a forma inorgânica, sendo possível assim a determinação de Hg total nas amostras. Contudo, o sistema convencional aberto apresentou limitações devido a baixas recuperações, visto que este elemento é extremamente volátil e o preparo de amostras para a sua quantificação se torna difícil. O sistema com dedo frio é seguro para a quantificação de voláteis, pois ótimas recuperações foram obtidas em um procedimento de decomposição simples, o qual utiliza apenas HNO₃ como meio oxidante. Além disso, o procedimento proposto mostrou-se simples e rápido, pois pode ser adaptado a tubos digestores convencionais e o aquecimento ser realizado em bloco digestor.

O sistema de dedo frio desenvolvido pode ser considerado uma ótima alternativa para uso nos sistemas convencionais de preparo de amostras, pois além de apresentar eficiência e segurança, esse sistema é extremamente barato quando comparado com os fornos de micro-ondas, uma vez que estes são os mais cotados para o preparo de amostras e determinação de elementos voláteis. Isso proporciona o emprego de sistemas com dedo frio para procedimentos de rotina ou pesquisa, pois nem sempre se tem a disponibilidade de equipamentos mais sofisticados para essa finalidade. Além disso, o uso de tal sistema se torna atrativo para outras amostras, bem como para a determinação de demais elementos, expandindo assim as aplicações para este método de preparo de amostras.

O presente estudo gerou publicação em uma revista internacional denominada *Microchemical Journal*, a qual pode ser visualizada no Anexo 1.

CAPÍTULO 2

***Emprego de diferentes métodos para o preparo de amostras e
determinação de Cd, Pb e Sn em carnes por GF AAS.***

1. Introdução

A carne é um alimento que apresenta um alto teor de proteínas e vitaminas em sua composição nutricional, as quais são constituintes essenciais para os seres humanos [140]. Essas características fazem com que haja uma grande demanda desse produto, tornando-se assim um alimento comum na mesa de muitos brasileiros [141]. Além disso, o Brasil exporta anualmente uma quantidade expressiva de carne bovina *in natura*, o que faz com que o nosso país seja conhecido como um dos maiores produtores e exportadores desse produto alimentício [142, 143].

O mercado de carnes *in natura* não é o único em destaque, visto que o consumo de alimentos processados vem expandindo muito nos últimos anos, principalmente em grandes metrópoles. Essa demanda está associada principalmente a rapidez e praticidade, uma vez que muitas pessoas, devido a situações diárias, preferem consumir alimentos prontos, baratos e de fácil acesso [144, 145]. Independente do tipo de produto cárneo é necessário que haja um controle de qualidade, a fim de evitar que alimentos contaminados possam vir a ser consumidos pela população. Além disso, tal fato pode também afetar as exportações, refletindo diretamente na economia nacional [143].

Dentre os contaminantes que podem ser encontrados em alimentos, os metais tóxicos merecem extrema atenção, devido às inúmeras patologias que tais elementos podem causar aos seres humanos. Os metais tóxicos (como Cd, Pb e Hg) estão inseridos dentro de uma classificação de compostos químicos considerados emergentes, podendo assim estar presente em uma variedade de produtos comerciais [146]. Com isso, existem normas regulamentadoras que estipulam limites máximos para a concentração de Cd, Hg, Pb e Sn, as quais prevalecem para produtos alimentícios comercializados e importados [56, 147]. Contudo, é necessário o emprego de métodos analíticos sensíveis e confiáveis para a quantificação e controle de tais elementos em diversos tipos de alimentos, incluindo produtos cárneos, pois assim é possível obter uma maior segurança alimentar [147, 148].

Para a determinação desses elementos tóxicos, a AAS apresenta-se como uma técnica bem sucedida para o controle de qualidade em alimentos,

devido a sua alta sensibilidade e especificidade [74, 149]. Para a quantificação de Hg, a técnica mais usual é a CVG AAS, onde maiores detalhes estão descritos no primeiro capítulo desta dissertação. Já para a determinação de Cd, Pb e Sn, a literatura reporta o uso da GF AAS como uma das técnicas mais utilizadas no controle desses elementos em diferentes tipos de matrizes [150-152]. Além da GF AAS, outras técnicas instrumentais baseadas em métodos óticos também podem ser utilizadas para a determinação de metais em matrizes biológicas, como a ICP-MS e ICP-OES. Contudo, o que faz a GF AAS ser atrativa é a possibilidade de alcançar valores relativamente baixos para o LD e o uso de pequenas quantidades de amostras [153].

Independente da técnica de detecção utilizada, a etapa de preparo das amostras é extremamente importante, visto que esta tem por finalidade a conversão da amostra em uma forma mais apropriada para introdução no equipamento de análise [15, 101]. Um método muito empregado para amostras biológicas é a decomposição ácida, a qual faz o uso de ácidos oxidantes fortes e temperaturas elevadas [15]. Contudo, tal método já foi citado e discutido no primeiro capítulo desta dissertação, o qual se torna muito atrativo quando se faz o uso de sistema com dedo frio acoplado a tubos do bloco digestor, minimizando assim o risco de perdas de analito ou ácido por volatilização.

Com a finalidade de avaliar qual o melhor método a ser empregado em cada tipo de análise química, a literatura reporta alternativas para o preparo de amostras biológicas, as quais merecem destaque devido à simplicidade e resultados satisfatórios. Um exemplo é o uso de TMAH, o qual recentemente vem sendo muito empregado para esse tipo de amostra [110, 154, 155], pois é capaz de formar uma suspensão em poucas horas a temperatura ambiente, tornando a solução estável por meses [108, 156]. Além do meio alcalino, também é possível a formação de uma suspensão em meio ácido com HCOOH, o qual também vem sendo bastante utilizado para amostras biológicas, pois trata-se de um procedimento simples, seguro e na maioria das vezes não necessita de energia para o aquecimento da solução [157, 158]. Tais métodos que envolvem a formação de suspensões apresentam vantagens em serem menos susceptíveis a contaminações, devido a mínima manipulação das amostras quando comparado com outros métodos de preparo. Contudo,

quando se usa suspensões, um aspecto importante que necessita ser avaliado é a homogeneidade e estabilidade das soluções [159].

Para a etapa de preparo de amostra, estudos comparativos tornam-se interessantes, pois assim é possível apontar os pontos positivos e negativos para cada método avaliado, definindo então qual o melhor a ser adotado para as condições de análise estipuladas (técnica de detecção, natureza de amostra e analitos quantificados) [110].

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo geral o emprego de diferentes métodos de preparo de amostras de carnes para a determinação de Cd, Pb e Sn pela técnica de GF AAS.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o método de decomposição ácida com HNO_3 em um sistema com dedo frio para o tratamento das amostras;
- Avaliar métodos de preparo de amostras baseado em uma solubilização, tanto em meio alcalino com TMAH como em meio ácido com HCOOH ;
- Comparar os resultados obtidos para os três diferentes métodos de tratamento das amostras;
- Enfatizar qual é o melhor método a ser empregado para o preparo de amostras biológicas;
- Confrontar os resultados obtidos com os limites máximos estabelecidos por normas regulamentadoras, indicando assim se o produto é apropriado, ou não, para o consumo humano ou ser exportado.

3. Revisão da Literatura

3.1. Produtos alimentícios cárneos: consumo no Brasil e no mundo

A alimentação é uma prática essencial para a manutenção da vida, ou seja, através dela é possível obter energia suficiente para a síntese de tecidos, bem como regular o funcionamento dos órgãos. Além disso, os alimentos também são importantes para processos de excreção e para proporcionar disposição física para atividades do dia a dia. Todas essas potencialidades dos alimentos são devido ao seu valor nutricional, uma vez que as proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais são nutrientes fundamentais para suprir as necessidades diárias do nosso organismo [160, 161].

Dentre os alimentos desejáveis à alimentação, Evangelista [161] divide-os em cinco grupos básicos, de acordo com a composição em nutrientes. As carnes encontram-se no grupo onde há predominância de proteínas, no qual também estão listados alimentos como ovos, leguminosas e frutas secas oleaginosas. As proteínas exercem importantes funções em nosso organismo, como por exemplo a de catalisador biológico e de componente estrutural da célula [160, 161]. As carnes apresentam de 18 a 23 % (m/m) de proteínas, podendo assim ser considerada um alimento importante para o consumo humano por ser fonte desse nutriente [162].

Apesar da carne ter a sua importância para a alimentação, existe uma grande parcela brasileira, aproximadamente 9% da população, que é vegetariana, ou seja, não se alimenta de nada que implique o sacrifício de animais [163, 164]. A Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB) lançou no ano de 2012 um guia para uma dieta vegetariana, no qual são informadas outras fontes de proteínas a fim de suprir a necessidade do consumo de carnes, garantindo assim que não se tenha uma desnutrição proteica [163]. Contudo, a grande maioria da população ingere carne de algum tipo em sua alimentação, tornando-se assim um alimento popular e que merece atenção a fim de garantir segurança alimentar ao consumidor.

A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), a qual visa traçar um perfil

das condições de vida da população, fez um levantamento de dados de 2008 e 2009 para analisar o tipo de alimentação diária de famílias brasileiras. Segundo a POF, as maiores médias de consumo *per capita* foram para feijão (182,9 g/dia), arroz (160,3 g/dia) e carne bovina (63,2 g/dia). Esses dados mostram que a ingestão de carne pode ser considerada uma prática acentuada, uma vez que tal alimento encontra-se bem posicionado com relação aos mais de mil itens alimentares citados pelos consumidores [141].

Considerando os itens alimentares registrados pela POF, o gráfico na Figura 22 mostra em porcentagem o consumo diário *per capita* de uma forma geral (alimentos e bebidas).

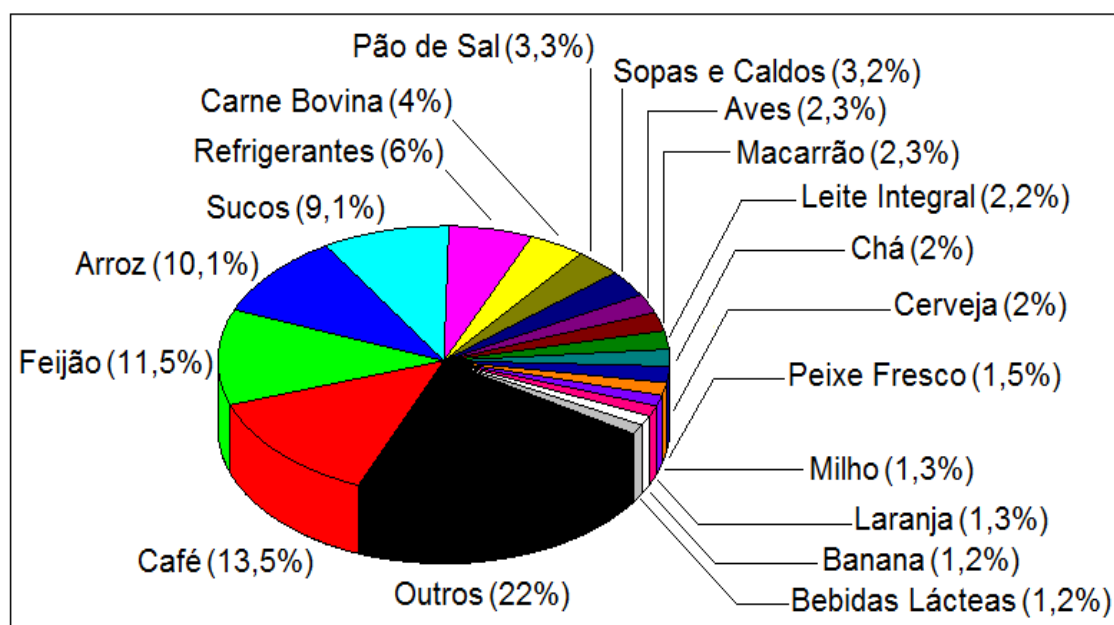


Figura 22 – Consumo alimentar médio *per capita* (em g/dia) da população brasileira no período de 2008 a 2009. Adaptado de IBGE-POF [141].

Como pode ser visualizada na Figura 22, a carne bovina detém de 4 % do consumo alimentar diário em média. Esse dado ainda pode ser dividido entre o sexo do consumidor, onde o homem contribui com uma parcela maior do que a mulher na ingestão de tal alimento [141]. Contudo, a POF é realizada com uma parcela da população brasileira em áreas estratégicas, como município das capitais e regiões metropolitanas, representando assim valores estimados para a situação alimentar das famílias brasileiras.

Além da carne bovina, os brasileiros consomem também uma

quantidade expressiva de carne suína e de frango. Segundo Souza e colaboradores [165], a quantidade de carne bovina e de frango consumida em 2010 é semelhante, enquanto que a carne suína detém de uma parcela menor do que a metade do valor registrado para as demais carnes. Esses autores projetaram o consumo dessas carnes para o ano de 2020, na qual são estimados dados para um maior consumo de carne de frango, seguido da carne bovina e por fim a carne suína, que representa um valor de aproximadamente um terço do valor da carne de frango [165]. O aumento no consumo da carne de frango já é notório nos últimos anos, o que se deve principalmente ao baixo custo desse alimento quando comparado com a carne bovina e suína, além de apresentar um menor teor de gordura [166].

Ainda seguindo em termos de projeções futuras, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estimou a quantidade de carne em geral consumida para o ano de 2050 nos diferentes continentes. Segundo esses dados, a América do Norte e a Europa continuarão consumindo mais carnes do que o resto do mundo, tendo uma significância de 89 Kg por pessoa ao ano. Já para a América Latina, o qual abrange o nosso país, o valor ao ano é de 77 Kg por pessoa, sendo essa quantidade superior aos outros continentes como a África e a Ásia [167].

Considerando índices mundiais de consumo de carne, a FAO realizou um levantamento onde aponta a quantidade anual *per capita* em diversos países. Tais dados são referentes ao ano de 2007, mas apesar disso pode-se ter uma ideia de quais os países líderes e os menos favorecidos na ingestão de tal alimento. A Figura 23 mostra um esquema com os continentes do mundo, destacando alguns dos países e seus respectivos valores de consumo de carnes em um modo geral, ou seja, o consumo de carne bovina, suína, de aves e entre outras. Ainda segundo a FAO e de acordo com os dados expressos nesse estudo, a média mundial de consumo de carnes é de 46,6 Kg por pessoa ao ano, onde o extremo máximo é referente a Luxemburgo, com um valor de 136,73 Kg, e o extremo mínimo é para a Índia com 3,26 Kg em produtos alimentícios cárneos [168].

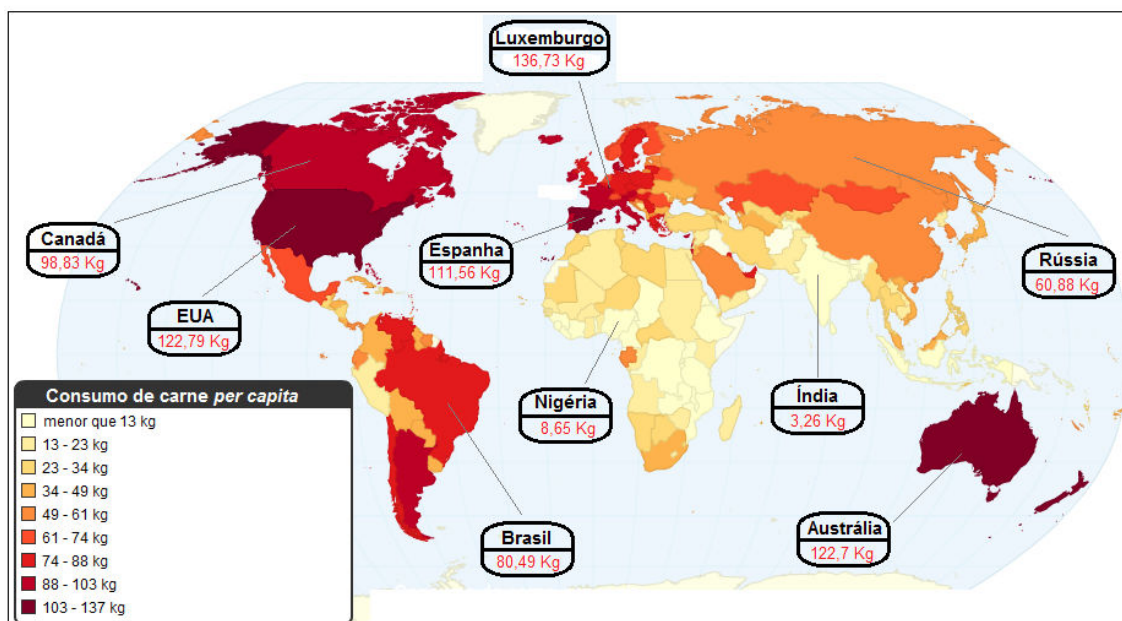


Figura 23 – Consumo anual *per capita* (em Kg) para os países do mundo no ano de 2007. Adaptado de FAO [168].

Além do consumo de carnes *in natura*, alguns brasileiros acabam procurando muitas vezes por uma alimentação rápida e prática, a qual envolve na maioria das vezes a adição de carne do tipo processada, tais como salsichas, hambúrgueres, almôndegas, presuntos e entre outras [110]. Essa procura por uma alimentação fora de casa é decorrente de uma adaptação da população aos horários diários, ou seja, a grande carga horária de trabalho, o trânsito e a pressa cotidiana contribuem como principais motivos para a atração dos consumidores a novos hábitos alimentares [169, 170]. Contudo, segundo Santos e colaboradores [169], a procura por alimentos rápidos industrializados pode levar a casos de aumento no Índice de Massa Corporal (IMC) e ganho de peso, os quais se devem aos elevados teores calóricos, gorduras totais e saturadas.

De acordo com os dados informados sobre o consumo de produtos cárneos, é notório um aumento na demanda de tais alimentos pela população. Essa procura é referente tanto para um mercado interno como para o externo, refletindo assim em um maior comprometimento por parte de órgãos fiscalizadores sobre a segurança alimentar, a fim de garantir que nenhum consumidor nacional ou estrangeiro venha a ingerir um produto fora dos padrões legais de qualidade [171].

3.2. Exportação e Importação

O Brasil vem alcançando ganhos extraordinários com o seu desempenho em exportações, o que faz de nosso país um mercado competitivo diante de outras tantas potências mundiais em exportações. Tal expansão vem evidenciando resultados favoráveis tanto em termos absolutos quanto em proporção do Produto Interno Bruto (PIB) [172].

Considerando o destino dos produtos brasileiros, as exportações estão sendo diversificadas para novos mercados internacionais, o qual é um resultado da grande expansão em termos de produção nacional, e também para países já conhecidos comercialmente, como os Estados Unidos e os da Europa. Avaliando especificamente os produtos agropecuários, o comércio internacional tem crescido muito nos últimos anos não só para os países já citados, mas também para a Ásia e o Oriente Médio. Dentre esse itens exportados e mais importantes à economia nacional, destaca-se o açúcar, soja e derivados, suco de laranja, café e carnes [173]. Com relação a produtos alimentícios de carnes, o Brasil destaca-se como um grande produtor e exportador, uma vez que tal produto tem um custo inferior aos produzidos pela própria Europa [143]. A Figura 24, a qual foi elaborada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mostra a evolução da balança comercial brasileira em exportações nos últimos 23 anos [142].

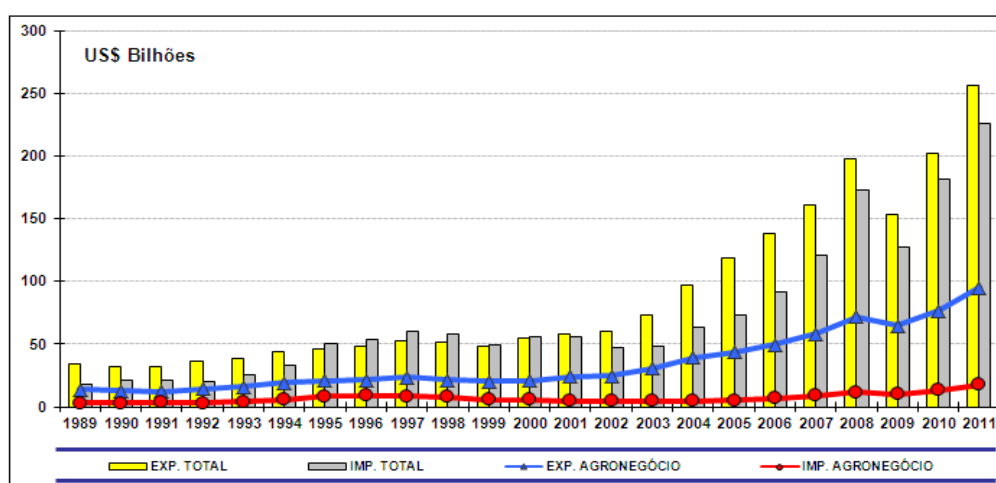


Figura 24 - Evolução anual da balança comercial brasileira e do agronegócio – 1989 a 2011 – (em US\$ bilhões). Adaptado de MAPA [142].

Observando a tendência do comércio internacional de acordo com a Figura 24, há uma evolução também no setor de importações totais, a qual se deve possivelmente a proporções favoráveis da taxa cambial [142].

A pecuária assume grande expressão no agronegócio brasileiro, uma vez que o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, caracterizando assim o país como um dos maiores exportadores de carne do mundo [174]. A Figura 25, a qual foi elaborada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostra o efetivo de rebanhos brasileiros ao longo de 36 anos, pela qual é possível notar um aumento considerável para o rebanho da espécie bovina e de galinhas, além de um aumento ainda mais expressivo para a classe dos galos, frangos e pintos [175].

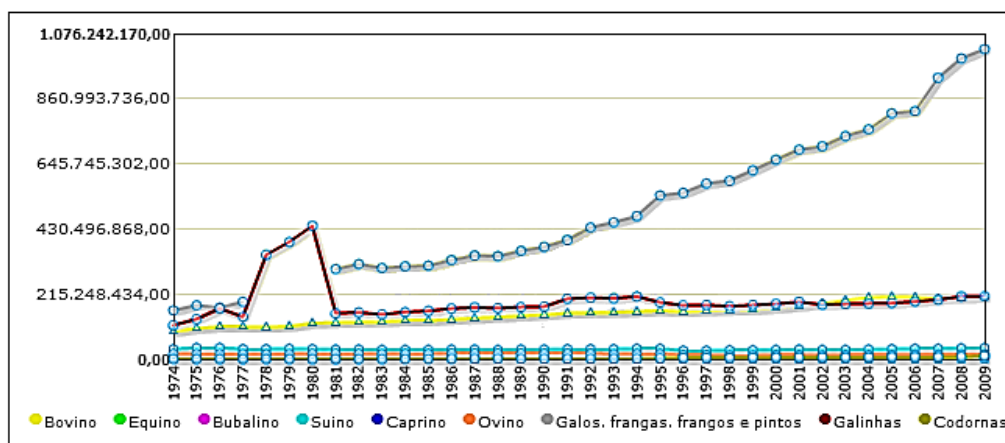


Figura 25 – Rebanhos brasileiros para diferentes espécies de animais. Adaptado de IBGE [175].

O Brasil teve um aumento expressivo no mercado internacional a partir de 2003, onde o valor das exportações ultrapassou a casa de um bilhão de dólares somente para a carne bovina *in natura*. Esse aumento expressivo nas exportações de tal alimento se deve a diminuição do volume exportado pelos tradicionais fornecedores internacionais, os quais enfrentaram problemas como o caso da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB – “Vaca Louca”), que foi diagnosticada em 2003 e 2005, afetando principalmente o mercado Americano. Outro caso que merece destaque é a febre aftosa, a qual provocou uma diminuição de outros mercados de expressão, como a Argentina e a Inglaterra [176,177].

Dentre os principais produtos cárneos exportados para o mercado

internacional, destaca-se a carne bovina, suína e de frango, todas do tipo *in natura* e também processadas [142]. A Tabela 5 mostra a quantidade, em dólares e em toneladas, dos diferentes tipos de carne brasileira exportada no ano de 2011.

Tabela 5 – Exportação brasileira de carnes no ano de 2011. Adaptada de MAPA [142].

Carne	Valor Mil (US\$)	Quantidade (t)	Preço médio (US\$/t)
Bovina <i>in natura</i>	4.169.285	820.239	5.083
Bovina Processada	615.338	102.728	5.990
Suína <i>in natura</i>	1.286.259	436.128	2.949
Suína Processada	41.013	12.541	3.270
Frango <i>in natura</i>	7.063.214	3.569.903	1.979
Frango Processada	433.689	137.589	3.152

Segundo esses dados de 2011, o maior importador na atualidade da carne bovina e suína *in natura* é a Rússia, a qual detém de aproximadamente 28 % da quantidade total, em toneladas expressa na Tabela 5, para ambos os produtos. Já para a carne de frango *in natura*, o maior importador em quantidade é a Arábia Saudita com aproximadamente 17%, mas o maior importador em valor da carne de frango brasileira é o Japão, que chega a pagar 2.990 US\$/t contra 1.941 US\$/t pagos pela Arábia Saudita. Porém, considerando as carnes processadas, tem-se uma mudança no local de destino destes produtos, pois para a carne bovina o maior importador é o Reino Unido com aproximadamente 32 % do total exportado pelo Brasil. Para a carne suína processada, Hong Kong lidera a importação com aproximadamente 39% e para a carne de frango quem lidera é a Alemanha com 38%. Contudo, considerando apenas a carne bovina *in natura*, os números em exportações já foram maiores, pois em 2006 e 2007 o nosso país exportou mais de 1225 mil toneladas contra aproximadamente 820 mil toneladas no ano de 2011 [142].

O Brasil tem se esforçado para manter a liderança em exportação de carnes, uma vez que o comércio internacional tem apresentado diversos obstáculos para os produtores brasileiros. Em fevereiro de 2008, a União

Europeia (UE) suspendeu por tempo indeterminado as importações de carne in natura provenientes do Brasil devido ao não cumprimento das exigências sanitárias, o que foi alvo de críticas e ceticismo por parte dos produtores e exportadores brasileiros. Com isso, o governo brasileiro confirmou em esforçar-se para implementar um modelo favorável para adquirir a confiança do bloco europeu no trabalho sanitário. Esse esforço do país foi então reconhecido por Bernard Von Goethem, diretor de Saúde e Bem-Estar Animal da UE, que esteve em território brasileiro pra supervisionar o trabalho dos fiscais federais em inspeção às fazendas autorizadas. Von Goethem ainda assegurou a manutenção das exigências e apontou que alterações nas regras do sistema de rastreamento não serão aceitas pela UE, já que tal cuidado é visto como indispensável à segurança alimentar [143, 178, 179].

Com base nisso, a Comunidade Europeia publicou recentemente os níveis máximos de certos contaminantes em gênero alimentícios a serem comercializados e importados pelos países membros da comunidade [56]. Dentre esses contaminantes, os metais pesados merecem uma atenção especial, uma vez que esses podem reagir com uma série de moléculas presentes em sistemas do nosso organismo, conferindo-os características de bioacumulação [180].

3.3. Controle de metais em carnes

O processo de controle de qualidade de alimentos é uma garantia de que o consumidor esta ingerindo um produto adequado, ou seja, livre de um estado improprio à saúde humana. Tal controle deve ser realizado de uma forma efetiva, envolvendo assim processos como a produção, armazenamento, distribuição e o consumo do alimento. Com isso, é possível alcançar um estado de segurança alimentar, uma vez que os alimentos serão fiscalizados a fim de garantir que esteja livre de contaminantes de natureza química, biológica, física ou de outras substâncias que possam colocar em risco a saúde coletiva [181].

Considerando os metais na tabela periódica, existem alguns desses elementos que são essenciais para nosso organismo, tendo um papel fundamental em funções metabólicas [182]. Contudo, segundo Chowdhury [183] e colaboradores, pode-se ter a ocorrência de alterações metabólicas

crônicas devido à deficiência desses metais ou pelo excesso na concentração dos mesmos. Burguera [16] mostra em seu estudo uma tabela periódica com destaque para os elementos essenciais e os não essenciais, a qual encontra-se na Figura 26.

MACROELEMENTOS

ELEMENTOS TRAÇO

MICROELEMENTOS

ESSENCIAIS

TÓXICOS

ADICIONADOS

FUNÇÃO DESCONHECIDA

1 H																	2 He						
3 Li	4 Be																	5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg																	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr						
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe						
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn						
87 Fr	88 Ra	89 Ac																					
			58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu							
			90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr							

Figura 26 – Classificação dos elementos da tabela periódica. Adaptado de Burguera [16].

De acordo com a Figura 26, os elementos em destaque na cor verde oliva são os mais abundantes, compondo cerca de 93 % do peso corporal, seguidos pelos micronutrientes, de coloração amarela, os quais constituem cerca de 5 % do peso celular total. Como citado anteriormente, existem os metais que são essenciais à vida, os quais estão destacados na coloração verde. Além desses, existem também aqueles elementos que são introduzidos ao nosso organismo na forma de tratamentos especiais e os elementos considerados tóxicos que advêm por meio de exposição a ambientes contaminados [16].

Segundo o documento publicado pela comunidade europeia [56], são informados os limites máximos para metais como o Hg, Pb, Cd, e Sn em alimentos. Já a ANVISA [57], além desses quatro metais citados, ainda informa

os valores para outros dois elementos, como o As e Cu. Todos esses metais estão também citados em um documento elaborado pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) [184], em resolução referente ao ano de 2011. Contudo, em produtos alimentícios cárneos podem ser encontrados outros tipos de elementos, os quais advêm da própria composição mineral do alimento ou devido a contaminações, uma vez que a literatura reporta estudos envolvendo carnes para a determinação desses metais, essenciais e não essenciais, através do uso de diferentes técnicas analíticas [110, 183, 185].

Considerando os metais caracterizados como essenciais, é necessário que se tenha um controle no nível desses elementos em produtos alimentícios, uma vez que, conforme já citado, um excesso pode levar a efeitos deletérios a saúde humana. Como exemplo desse fato, é possível citar a ocorrência de quantidades de Fe em carnes, visto que tal alimento é rico neste metal, o qual possui importância na formação da hemoglobina e transporte de oxigênio para as células [186]. Contudo, uma quantidade excessiva na ingestão de Fe pode levar a um acúmulo de hemossiderina nos tecidos, produzindo assim a hemossiderose e hemocromatose, as quais são caracterizadas pela pigmentação da pele, lesão pancreática com diabetes, cirrose hepática e entre outros danos a saúde [187]. Outro exemplo claro é a ingestão de Na, uma vez que tal elemento é adicionado às carnes com a finalidade de conservação e para intensificar a percepção de sabor do alimento. A ingestão de quantidades superiores ao normal de Na pode levar a problemas de saúde como a hipertensão, doença essa que atinge um grande número de brasileiros [188].

A outra classe de elementos que necessitam serem controlados é dos metais tóxicos, visto que a ingestão de alimentos contaminados por tais elementos, até mesmo em baixas concentrações, pode levar a sérios danos a saúde humana [180, 183].

3.3.1. Contaminação com metais tóxicos

Os alimentos de uma forma geral podem ser contaminados por meio de diversos fatores, as quais podem se dar de forma direta, ocorrendo no próprio alimento de consumo, ou de forma indireta, onde ocorre no meio externo antes

mesmo de tal produto transformar-se apto ao consumo [161]. A Figura 27 mostra um esquema dos principais veículos de contaminação dos alimentos.

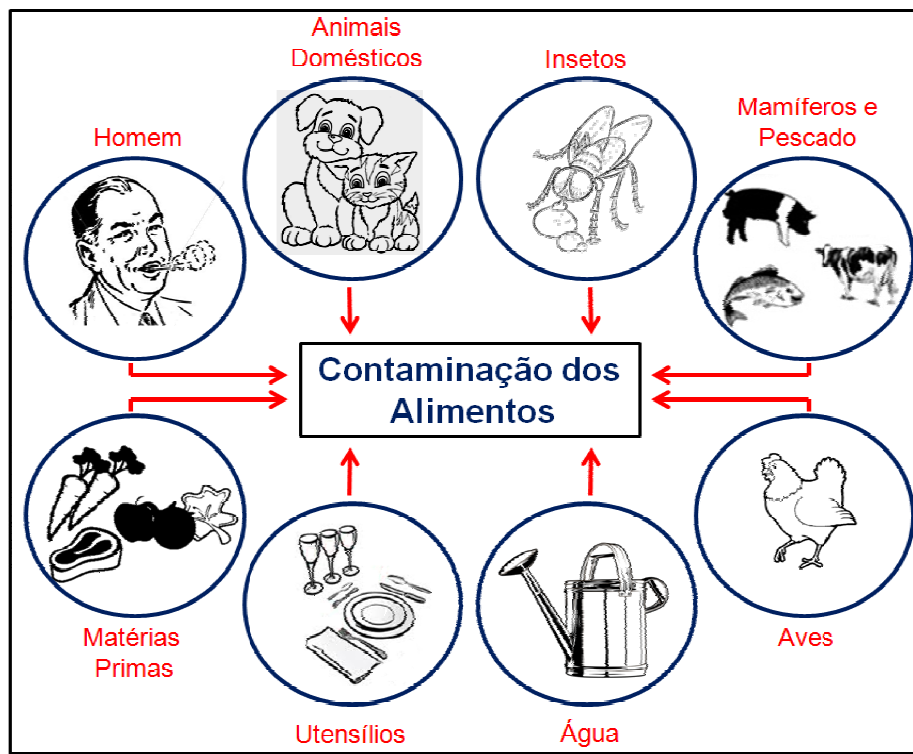


Figura 27 – Principais fontes de contaminação de alimentos em geral. Adaptado de Evangelista [161].

Considerando especificamente as carnes, essas podem ser contaminadas por via endógena, ou seja, ainda quando o animal está vivo, ou exógena, onde pode ocorrer desde a matança do animal até o consumo de seus produtos [161].

Para a contaminação por via exógena, deve-se tomar os maiores cuidados possíveis durante todas as etapas que antecedem a obtenção do produto final para consumo humano. Sendo assim, são necessárias boas práticas higiênicas, assegurando que todas as dependências do estabelecimento, os utensílios, os equipamentos, as embalagens e entre outros fatores estejam totalmente livres de qualquer possibilidade de gerar contaminações. Além disso, os manipuladores devem sempre estar em condições plenas de saúde, limpeza e desprovidos de qualquer hábito anti-higiênico. Todas essas precauções devem ser seguidas durante as etapas do

sacrifício animal, no momento do evisceramento, na separação da carcaça e também no transporte dos produtos [161, 189].

Na forma endógena, o alimento cárneo passa a ser impróprio devido às fontes de contaminação que o animal foi submetido, o que reflete consequentemente em uma contaminação humana por substâncias indesejáveis. Dentre essas substâncias, destina-se uma grande atenção para os metais tóxicos, uma vez que esses possuem a característica de não serem metabolizados, ou seja, são bioacumulados no interior do animal. Além disso, a forma química desses elementos pode ser alterada durante a passagem pelo intestino, podendo assim serem transformados em espécies ainda mais tóxicas [190, 191].

Uma das formas claras de contaminação animal por metais tóxicos é por meio do contato com o solo, ingestão de plantas ou águas contaminadas [192, 193]. Tais ocorrências podem estar ligadas a resíduos agropecuários, o uso de fertilizantes e pesticidas, água de irrigação contaminada, queima de biomassa na zona rural, emissões veiculares, lodos de esgoto, lixo urbano ou por resíduos industriais e de minerações, comprometendo assim o meio ambiente e refletindo diretamente na saúde do animal [180, 193, 194]. Além dessas formas antropogênicas de contaminação ambiental por metais pesados, também não se pode esquecer as fontes naturais, apesar de ter uma contribuição menor do que as formas já citadas [195].

Outra forma de levar a contaminação do animal é por meio da ingestão de suplementos alimentares impróprios, os quais, muitas vezes, são preparados com fontes de matérias primas de preço mais acessível e de baixa qualidade, o que pode levar à obtenção de um produto final contaminado por substâncias indesejáveis, incluindo os metais pesados. Essa produção é frequentemente realizada por indústrias a fim de ganhar mercado e garantir suas vendas, mas acabam menosprezando fatores como a qualidade e a segurança alimentar dos animais [196, 197]. Com isso, a comissão de regulação da UE publicou os limites máximos de alguns metais tóxicos em produtos alimentícios para animais, a fim de assegurar que tais alimentos estejam em condições próprias e sem risco de proporcionar qualquer tipo de contaminação [198].

Todas as fontes endógenas de contaminação citadas estão apresentadas na Figura 28, a qual esquematiza as formas de levar a contaminação do animal e a consequente contaminação humana.

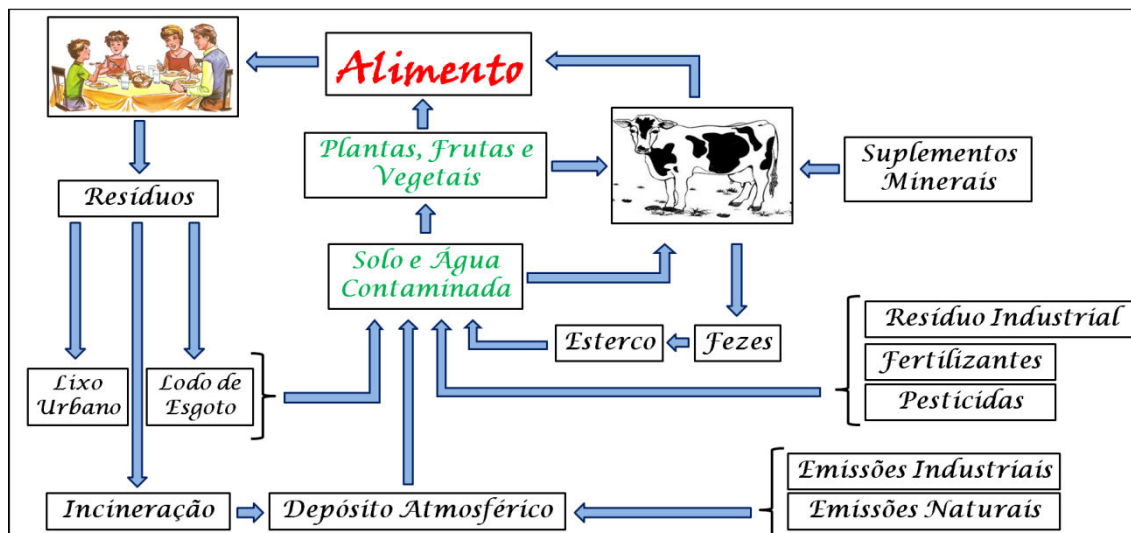


Figura 28 – Formas endógenas de contaminação da carne bovina. Adaptado de Morgulis [199].

Considerando esses metais tóxicos, Burguera [16] cita como tais elementos o As, Cd, Cr, Hg e Pb (conforme apresentado na Figura 26), onde esses mesmos foram também citados, com exceção do Cr, por Kan e Meijer [200] e por Andrée e colaboradores [201] em seus estudos de contaminação de produtos alimentícios. Entretanto, como já citado anteriormente, a UE informa os limites para o controle de Cd, Hg, Pb e Sn em alimentos, mostrando assim que também é importante a determinação de Sn, apesar desse não ser considerado tóxico quanto os demais elementos [56]. Para inspecionar tais alimentos, o governo federal criou um programa que é vinculado ao MAPA e denominado Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), o qual visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor [202]. O PNCRC publicou uma instrução normativa no ano de 2012, no qual é possível conhecer os limites de referência para alguns contaminantes inorgânicos em produtos alimentícios cárneos [203], conforme apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Limites de referência para contaminantes inorgânicos em carnes. Adaptado de PNCRC [203].

Produto Carneio	Matriz	Limites de Referência em $\mu\text{g Kg}^{-1}$			
		As	Cd	Pb	Hg
Bovina	Rim	1000	1000	500	—
	Músculo	—	—	—	30
Equína	Rim	—	—	500	—
	Músculo	—	200	—	—
Suína	Rim	1000	1000	500	—
	Músculo	—	—	—	30
Aves	Rim	—	1000	500	—
	Músculo	500	—	—	30
Peixe Captura	Músculo	1000	100	300	1000
Peixe Cultivo	Músculo	1000	50	300	500
Camarão	Músculo	1000	500	500	500
Avestruz	Fígado	1000	500	500	—

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, é possível ter uma idéia da concentração aceitável desses metais tóxicos em alimentos, além de evidenciar a necessidade do controle de qualidade em produtos cárneos de diferentes origens.

3.3.2. Contaminação por Sn

O Sn é um elemento metálico não ferroso e que pode ser considerado raro de ser encontrado na sua forma isolada. Contudo, esse metal é formador de um minério conhecido como cassiterita (óxido de estanho, SnO_2), o qual é frequentemente encontrado por ter importantes aplicabilidades [204, 205]. Algumas propriedades físico-químicas importantes do Sn estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Importantes propriedades físico-químicas do Sn. Adaptado de Lee [206] e de WHO [207].

Propriedade	Valor
Número atômico	50
Massa atômica	118,71 g mol ⁻¹
Temperatura de fusão	232 °C
Temperatura de ebulição	2602 °C

De acordo com a Figura 26, a qual foi adaptada de Burguera [16], o Sn é classificado como um elemento traço essencial. Contudo, segundo um relatório publicado pela *Food Standards Agency* (FSA), esse elemento não tem nenhuma função biológica comprovada, mas a ele pode ser sugerida a função de contribuir para a formação de estruturas macromoleculares, o qual é possível devido a sua coordenação química [208]. Além disso, Rüdel [209] informa em seu estudo que o Sn pode ser um componente iônico da gastrita, a qual trata-se de um hormônio que estimula a secreção de suco gástrico que é produzido no estômago.

Apesar do Sn não ser considerado um elemento tóxico e apresentar alguns indícios de essencialidade, quando encontrado em quantidades excessivas no organismo pode causar efeitos deletérios a saúde humana. Uma forma possível de alcançar tais níveis altos é através do consumo de alimentos ou bebidas que estejam em contato com embalagens metálicas, ou seja, embalagens que contêm uma camada de revestimento interno com Sn, podendo assim levar à contaminação dos alimentos por este metal [210, 211]. Contudo, essas folhas de flandres são muito empregadas em embalagens devido a um aumento no tempo em que os produtos alimentícios podem ficar estocados nas prateleiras dos comércios, a fim de serem adquiridos pelo consumidor. Esse tempo é possível devido à obtenção de embalagens hermeticamente seladas, impedindo assim a entrada de oxigênio ou qualquer outro tipo de matéria indesejável que venha a danificar o alimento no interior da lata [211]. Por outro lado, nunca se deve adquirir ou consumir alimentos que estejam em latas amassadas, uma vez que a película de Sn é rompida, gerando assim a corrosão do ferro que constitui a embalagem, bem como a

contaminação do alimento por ambos os metais. Essa dissolução dos metais é influenciada por fatores como a composição do alimento, a acidez, presença de oxigênio, tempo e temperatura de estocagem [212, 213].

A ANVISA publicou uma portaria em 1996 [214] a qual regulamenta a quantidade de Sn que deve conter no interior das embalagens metálicas de alimentos. Segundo essa portaria, a folha de flandres com envernizamento interno deve conter aproximadamente uma massa nominal de 2,8 g de Sn/m², para o contato direto com produtos alimentícios de uma forma geral. Entretanto, em 2007, outro documento publicado pelo mesmo órgão vem a revogar a portaria anterior de 1996, no qual não consta os valores recomendados para a camada de Sn, mas informa que esta deve ser suficiente para cumprir as funções tecnológicas das embalagens em geral [215]. Com isso, fica evidente que deve-se monitorar tais embalagens, a fim de avaliar se esta camada contém uma concentração pequena de Sn e suficiente para não conservar de forma adequada o alimento, ou uma concentração alta e suficiente para contaminar o alimento de forma intolerável.

A formação de folhas de flandres é uma das grandes aplicabilidades desse elemento, que, além disso, também pode ser empregado em outros campos, como na formação de ligas metálicas (por exemplo, solda e bronze) [204]. Em 2009 foi publicado um documento desenvolvido pelo Ministério de Minas e Energia (MME) que consta uma relação entre o consumo brasileiro de Sn, pela qual é possível perceber que a demanda maior por este metal é para a produção de folhas de flandres (aproximadamente 44 %) [216]. Tal relação está apresentada na Figura 29.

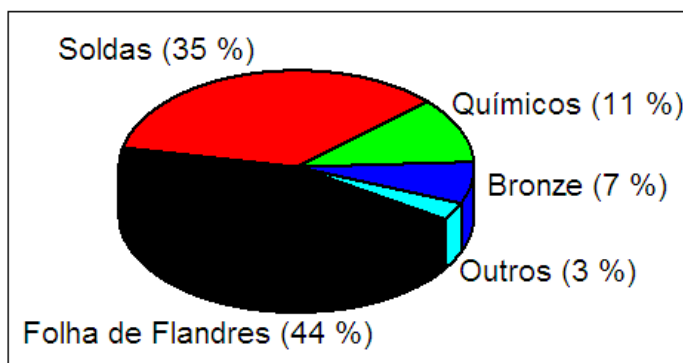


Figura 29 – Consumo setorial brasileiro de Sn. Adaptado de MME [216].

O Sn por muito tempo foi empregado em tintas anti-incrustantes para o revestimento de cascos de navios, onde o princípio ativo era os compostos tributilestanho (TBT) e/ou trifenilestanho (TPT), aumentando assim a eficiência e durabilidade destes cascos. Contudo, diversos problemas começaram a surgir por conta da contaminação ambiental por esses compostos, refletindo em uma série de efeitos deletérios em espécies marinhas. Isso fez com que a *International Maritime Organization* (IMO) banisse o uso de tintas contendo esses compostos, onde o início de tal impedimento foi em 2003, mas teve um limite estendido até 2008 para eliminar totalmente o revestimento das estruturas de navios em operação [217]. Esse tipo de contaminação ambiental é um exemplo que gera preocupações relevantes, pois assim é possível levar a contaminação humana por meio de consumo de produtos alimentícios marinhos ou outros tipos de alimentos, conforme apresentado na Figura 28.

Conforme já comentado anteriormente, a UE informa os limites máximos de Sn em alimentos, os quais representam um valor de 200 mg Kg^{-1} para alimentos enlatados em geral, com exceção de bebidas, uma vez que para essas o valor máximo permitido é de 100 mg Kg^{-1} . Tal limite é ainda menor (50 mg Kg^{-1}) para outros tipos de produtos alimentícios, como os destinados para bebês ou fins medicinais e os processados à base de cereais para jovens e crianças [56]. Já a ANVISA também informa os limites para esse elemento, porém apenas para sucos de frutas cítricas enlatadas, representando um valor de 150 mg Kg^{-1} , pelo qual já possível ter uma ideia de qual a concentração tolerável também para os alimentos [57].

Conforme visualizado na Figura 29, existem outras formas que levam ao contato humano com este metal, podendo assim alcançar níveis tóxicos e prejudicar a saúde. Tal intoxicação pode se dar por inalação de fumos e poeira contendo Sn, levando assim a deposição deste metal nos pulmões e caracterizando uma doença denominada estanhose, a qual não provoca sintomas, mas apresenta imagens radiológicas dramáticas [218].

Outra forma de intoxicação é por meio de ingestão de alimentos contaminados, onde esse metal pode ser absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI) e provocar danos a saúde. Tal absorção pelo TGI é menor para o Sn na

sua forma inorgânica do que para a forma orgânica, onde os compostos mais tóxicos são o trimetilestanho e trietilestanho [219]. A ingestão de uma dose elevada de Sn pode causar uma série de efeitos deletérios, tais como náuseas, vômitos, diarreia, cólicas abdominais, febre, dor de cabeça, anemia, danos no fígado e rins [210, 219, 220]. Além disso, para os dois compostos orgânicos considerados os mais tóxicos, a saúde humana pode sofrer danos ainda mais graves, como edema cerebral, encefalopatia e distúrbios visuais. Isso se dá possivelmente devido a alterações no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, o que leva a sérios problemas ligados ao SNC [219].

Outros efeitos deletérios podem ser buscados na literatura, os quais vão depender da dose e o tipo de composto de Sn que fora ingerido [219]. Isso faz com que uma atenção maior seja voltada ao controle desse metal em alimentos, a fim de garantir que tais danos não venham a afetar a saúde do consumidor.

3.3.3. Contaminação por Cd

O Cd é um metal que é conhecido fisicamente por ter um aspecto branco acinzentado, o qual também pode se apresentar na forma prata esbranquiçado ou metálico lustroso. Este elemento pode ser considerado relativamente raro, uma vez que não é encontrado na natureza em sua forma pura. Contudo pode ser encontrado como minério, principalmente associado a sulfetos em minérios de zinco, chumbo e cobre [1, 221]. A Tabela 8 mostra algumas importantes propriedades físico-químicas do Cd.

Tabela 8 – Importantes propriedades físico-químicas do Cd. Adaptado de Azevedo [1].

Propriedade	Valor
Número atômico	48
Massa atômica	112,41 g mol ⁻¹
Temperatura de fusão	320,9 °C
Temperatura de ebulição	767 °C

Em termos de produção, o Brasil caracteriza-se como sendo um país que não apresenta Cd em suas principais reservas de minerais. Contudo, esse elemento é muito utilizado mundialmente em diversos setores, tais como em revestimentos de aço ou ferro, estabilizador em plásticos de cloreto de polivinil (PVC), em pigmentos para plásticos e vidro, em baterias e entre outros usos [222, 223]. Em 2008 a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) [223] publicou um documento a respeito da toxicidade do Cd, no qual constam os setores em que esse elemento é mais utilizado, divididos em termos de porcentagem e apresentado na Figura 30.

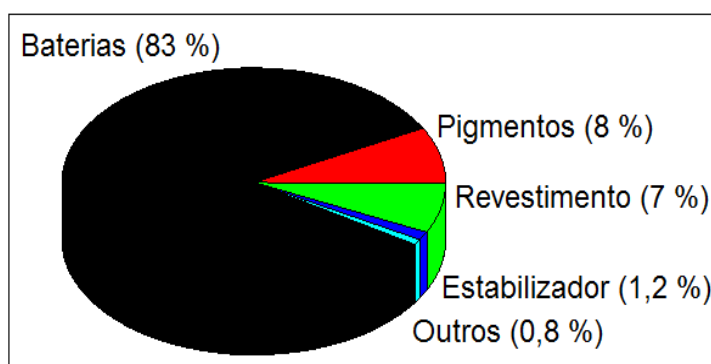


Figura 30 – Principais fontes de uso de Cd mundialmente. Adaptado de ASTDR [223].

Essas fontes de Cd podem levar a uma contaminação ambiental, uma vez que quando não tomados os devidos cuidados pode caracterizar como uma fonte antropogênica. Além disso, também podem ser consideradas fontes antropogênicas as emissões industriais, o uso de combustíveis contaminados e práticas de mineração. Como fontes naturais, as atividades vulcânicas e a erosão de rochas sedimentares e rochas fosfáticas são as principais formas de contaminação do ar, solos e rios [1]. Isso leva consequentemente a uma exposição humana a esse elemento, o qual trata-se de um metal tóxico conforme mostrado na Figura 26. Essa exposição pode ser através de um contato direto com o meio ambiente contaminado ou por meio do consumo de alimentos contendo níveis desse elemento, principalmente produtos cárneos de origem animal, que podem ser expostos conforme fora apresentado na Figura 28, ou produtos de origem vegetal que podem captar esse metal diretamente

do solo [222].

Existe uma classe de indivíduos que estão expostos diariamente a uma série de contaminantes, inclusive o Cd, mas que muitas vezes não apresentam conhecimento o bastante para deixar de consumir tal produto viciante [222, 224]. Essa classe é dos fumantes, os quais acabam acumulando naturalmente altas concentrações desse elemento no organismo, podendo levar a diversas patologias, tais como enfisema, pneumonias e câncer, as quais são causadas não só pela ingestão desse metal tóxico, mas também pelos mais de 4700 substâncias contidas na fumaça de um cigarro [222, 225, 226]. Além desses fumantes, outro grupo de risco são os chamados fumantes passivos, que são aquelas pessoas que não fumam diretamente, mas tem um contado com a fumaça do cigarro de outras pessoas que estejam em um mesmo ambiente [222]. Segundo o Ministério da Saúde (MS) [227], um levantamento foi realizado em 2011 no qual consta que aproximadamente 14,8 % dos brasileiros são fumantes, tendo uma maior contribuição para essa marca pessoas do sexo masculino. Tais pessoas acabam colocando em risco a sua própria saúde, uma vez que a estimativa para os fumantes é de aproximadamente 1,7 μg de Cd por cigarro, valor esse que pode ser considerado alto para aquelas pessoas que ingerem vários cigarros diários, além de se tratar de um metal extremamente tóxico [1].

Assim como já mencionado anteriormente para o Sn, existe um nível máximo tolerável de Cd para alimentos de consumo humano. A UE informa tais limites de uma forma especificada, ou seja, há uma divisão entre os alimentos com os seus respectivos valores máximos e aceitáveis para esse metal tóxico. Dentre esses alimentos, destaca-se a carne (exceto miudezas) bovina, suína, ovina e de aves, as quais tem um valor limite de 0,05 mg Kg^{-1} para esse elemento. Esse valor também pode ser considerado para algumas carnes de peixe, mas a UE informa valores superiores, podendo chegar a 1,0 mg Kg^{-1} para algumas espécies específicas de origem marinhas, as quais são listadas no documento emitido por esse órgão regulamentador. Para carne de fígado e rim de animais de uma forma geral, esse valor limite é de 0,5 e 1,0 mg Kg^{-1} , respectivamente. Também são informados valores para arroz, trigo, soja, legumes de folhas, ervas frescas e cogumelos, o qual trata-se de 0,2 mg Kg^{-1} ,

para legumes e frutas de um modo geral, que é de $0,05 \text{ mg Kg}^{-1}$, e para produtos alimentícios de caule, raízes e batatas, que é de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ para esse elemento tóxico [56]. Já a ANVISA, informa limites máximos de Cd somente para peixes e produtos de pesca, o qual é equivalente a $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ [57]. Apesar de não haver um maior detalhamento sobre o limite permitido para este metal em demais tipos de alimentos, a ANVISA informa um limite que é considerado o maior valor em concentração quando comparado com todos os valores listados no documento da UE.

Altas concentrações de Cd no organismo humano podem causar diversos efeitos deletérios em vários órgãos e tecidos, mas segundo Cardoso e Chasin [222] os órgãos mais visados são os rins e o fígado. Esse elemento altera o metabolismo de outros elementos químicos ditos essenciais, tais como o Zn, Fe, Cu e Se. Além disso, a hipótese existente de como ocorre o mecanismo que induz a toxicidade por esse metal é através de uma interferência do complexo Zn-proteína, o qual é responsável por controlar a transcrição do DNA, levando assim a apoptose, ou seja, a morte celular [222, 223]. Com relação a casos relatados de intoxicação humana por esse metal, o mais conhecido aconteceu em 1912 na região de Funchu-Machi no Japão, onde centenas de pessoas foram intoxicadas pela ingestão de arroz contaminado por água de irrigação proveniente de efluentes de uma indústria processadora de Zn e Pb. Essas pessoas relataram dores reumáticas e mialgias, acompanhadas de deformidades ósseas e distúrbios renais, o que veio a deixar esse fato conhecido como a doença de *Itai-Itai*, que significa uma expressão de dor [222, 228].

De acordo com Cardoso e Chasin [222] é possível conhecer outros casos de intoxicação humana por Cd, ocorrendo por meio de acidentes ecológicos e registrando diversas patologias em muitas pessoas. Isso mostra a importância do monitoramento de alimentos e do meio ambiente, a fim de avaliar níveis desse metal tóxico, impedindo assim que casos clínicos de intoxicação por esse elemento seja registrado.

3.3.4. Contaminação por Pb

O Pb é um metal que pode ser considerado relativamente comum de ser encontrado na crosta terrestre, principalmente na forma de sulfeto de chumbo (PbS). Além disso, uma grande parcela desse elemento na natureza é decorrente de emissões vulcânicas, a qual é a principal fonte natural de ocorrência desse elemento no meio ambiente. Este metal tem algumas características próprias como a sua coloração de cinza-azulado, não apresentar odor e de ser um metal maleável, o que facilita trabalhos de moldagem e corte com esse metal [1, 229]. Algumas de suas principais propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Importantes propriedades físico-químicas do Pb. Adaptado de Azevedo [1].

Propriedade	Valor
Número atômico	82
Massa atômica	207,19 g mol ⁻¹
Temperatura de fusão	327,5 °C
Temperatura de ebulição	1740 °C

O Pb é um metal que tem uma grande aplicabilidade na indústria, refletindo em um importante produto comercial, pois além de apresentar uma boa maleabilidade conforme já citado, esse metal apresenta propriedades excelentes como a alta resistência à corrosão, alta densidade, alta opacidade aos raios X e gama e estabilidade química no ar, solo e água [230]. Segundo dados da *International Lead Association* (ILA), no ano de 2008 aproximadamente 8,5 milhões de toneladas de Pb foram produzidos mundialmente para fins de aplicação industrial [231]. Esses dados são melhores visualizados no gráfico da Figura 31.

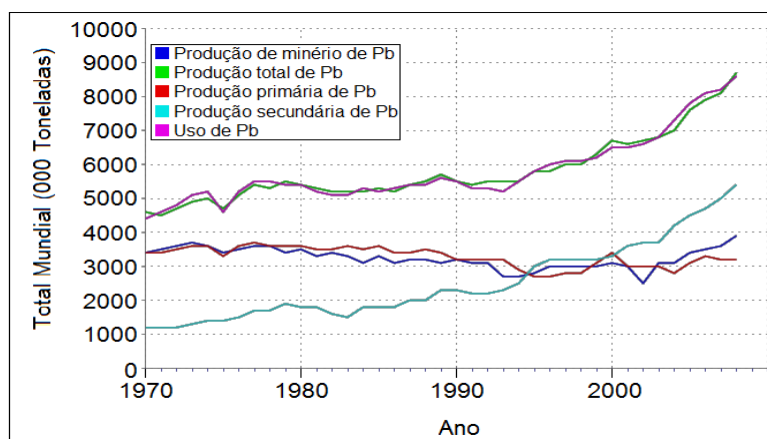


Figura 31 – Estatística da produção e uso de Pb mundialmente. Adaptado de ILA [231].

Considerando esses números de produção, o país que lidera essa prática é a China com aproximadamente 60 % da produção mundial, de acordo com dados da ILA de 2008 [231]. Esses dados de produção encontram-se mais atualizados segundo a *International Lead and Zinc Study Group* (ILZSG), no qual consta que no ano de 2011, mais de 10,5 milhões de toneladas de Pb foram produzidos [232]. Toda essa produção de Pb tem como principais aplicações na construção de lâminas ou canos para indústrias químicas e de construção. Além disso, também pode ser usado como um ingrediente de solda e em materiais de revestimento na indústria automotiva, como um material protetor contra radiações ionizantes, como componente na manufatura da borracha e de baterias, como ingredientes de tintas e dentre outras aplicações citadas na literatura [230].

A exposição humana a este metal pode se dar diretamente pelo meio ambiente, pois além da parcela antropogênica de contaminação ambiental, existe uma grande contribuição por emissões naturais, podendo levar ao comprometimento de solos, rios e o ar por elevados níveis desse elemento [1]. O meio ambiente está diretamente ligado à alimentação, o que se torna uma das principais fontes de contaminação humana por esse elemento considerado tóxico. Contudo, segundo Paoliello e Chasin [230], produtos alimentícios provenientes de plantas são mais propícios a apresentarem uma maior concentração de Pb do que os de origem animal.

Assim como para o Cd e Sn, também existe um controle com a

publicação de níveis máximos permitidos de Pb em alimentos realizados pela UE [56] e ANVISA [57]. A UE trás informações a respeito de diversas classes de produtos alimentícios, como por exemplo, para carne (excluindo miudezas) bovina, ovina, suína e de aves, a qual o valor limite é de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ para esse elemento. Além desse alimento, há informações de limites permitidos também para miudezas das respectivas carnes já citadas, o qual trata-se de $0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$, para produtos de origem marinha, onde o valor permitido desse metal pode variar entre 0,3, 0,5 e $1,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ dependendo do tipo de peixe em questão, para leite e produtos a base de leite, que é de $0,02 \text{ mg Kg}^{-1}$, para cereais, legumes e leguminosas, que trata-se de $0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ e para batatas, frutas, óleos e gorduras, que é de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$. Também é possível conhecer os valores de Pb permitidos para bebidas, como sucos de frutas concentrado e vinhos, onde o valor limite é de 0,05 e $0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ para esse metal tóxico, respectivamente [56]. Para o órgão de regulamentação nacional, a ANVISA trás informações para uma quantidade menor de alimentos quando comparado com o documento emitido pela UE. A maioria dos produtos alimentícios informados pela ANVISA não são comuns entre os alimentos da UE, mas para os óleos e gorduras, os quais são produtos em comum, a concentração permitida de Pb é a mesma para ambos os órgãos regulamentadores. Já para produtos como peixe e suco de frutas os valores em ambos os documentos se diferem, onde para a ANVISA esse limite é de 2,0 e $0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$, respectivamente. Para outros produtos também é possível conhecer o limite permitido para esse metal, como para caramelos, balas, cacau e dextrose o qual trata-se de $2,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ e para chocolates adoçados, que é de $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ [57]. Conhecendo todos esses limites informados, é possível manter um controle para que tais alimentos não entrem na mesa do consumidor com níveis alterados desse metal tóxico, uma vez que isso levaria a efeitos deletérios na saúde humana.

Com relação a toxicidade do Pb, esse elemento é capaz de se ligar preferencialmente a proteínas ligadas ao Ca, podendo assim inibir os processos que normalmente seriam realizados pela molécula de origem. Um exemplo de inibição é a liberação do neurotransmissor dependente de Ca, o que pode então ser prejudicada pela presença de Pb, resultando em alterações na comunicação intercelular. Além disso, esse metal pode ligar-se a

componentes enzimáticos como grupo sulfidril e amidas, levando assim a uma alteração em suas configurações e diminuindo as suas atividades [230]. De acordo com a literatura é possível verificar que este metal pode causar danos em diversos sistemas do corpo humano, como o cardiovascular, hematológico, renal, endócrino, neurológico, imunológico, gastrintestinal e reprodutivo [230, 233]. Diante de todos esses efeitos maléficos que esse metal pode trazer a saúde, a *World Health Organization* (WHO) sugere que deve haver um monitoramento do sangue de pessoas expostas ao Pb, bem como em produtos de gêneros alimentícios através de métodos analíticos sensíveis, a fim de identificar tais alimentos comprometidos e as fontes de contaminação, tornando assim essas informações públicas para que sejam tomadas as medidas mais apropriadas em cada caso [234].

3.4. Técnicas de análise para determinação de Cd, Pb e Sn

A escolha da técnica para uma análise química elementar é uma etapa extremamente importante, pois é a partir dessa que será possível a obtenção dos resultados de interesse para o controle dos constituintes de amostras de diversos tipos. Diante de uma série de técnicas analíticas, é preferível pensar em termos de natureza da amostra e elementos químicos a serem determinados, uma vez que assim é possível restringir essa quantidade de técnicas e facilitar na escolha de qual será a melhor para cada caso [75, 235].

Para a determinação dos três elementos em questão nesse capítulo (Cd, Pb e Sn) uma série de técnicas analíticas podem ser empregadas, onde cada uma apresenta as suas características específicas de operação [75]. A literatura reporta diversos estudos com o emprego de técnicas como o ICP OES [236-238] ou ICP-MS [239-241] para a determinação de Cd e Pb nos mais variados tipos de amostras. Além desses, também é possível encontrar estudos empregando ambas as técnicas analíticas para a quantificação de Sn [241-243]. Essas técnicas detêm de uma grande vantagem que é a capacidade de análises multielementares em diversos tipos de amostras, o que caracteriza uma maior rapidez para a obtenção das informações de interesse. Além disso, outras vantagens podem ser listadas de acordo com a literatura tais como

sensibilidade, seletividade e entre outras [244-245].

Considerando análises por AAS, já fora mencionado no primeiro capítulo desta dissertação que se trata de uma técnica bastante difundida dentro da química analítica, a qual é caracterizada por apresentar um baixo custo de operação quando comparada com as técnicas de plasma citadas anteriormente. Além disso, a técnica de AAS pode operar em três principais modos de atomização, com as quais é possível a quantificação de diversos elementos com sensibilidades distintas [64, 71]. A técnica de F AAS é muito usual e pode ser aplicada para a determinação de Cd e Pb por meio de uma chama ar/C₂H₂ e para Sn com essa mesma chama ou N₂O/C₂H₂. Contudo, muitas vezes as concentrações desses elementos presentes em amostras estão em um nível muito baixo, o que torna inviável a sua quantificação por F AAS, devido a sua baixa sensibilidade quando comparado com as demais formas de atomização em AAS [71, 246]. Outra forma de quantificação desses elementos é através da técnica de HG AAS, conforme já fora discutido e mostrado na Figura 13 (primeiro capítulo), com a qual é possível alcançar LDs semelhantes a GF AAS.

Dentre todas as formas de atomização em AAS, a literatura mostra vários estudos empregando a técnica de GF AAS para a quantificação desses três metais [150-152, 247, 248]. Tal técnica apresenta vantagens consideráveis sobre as demais citadas anteriormente, tais como o uso de pequenas quantidades de amostra, as quais podem ser preparadas de forma mais simplificada, como por exemplo para o uso de amostragem sólida, bem como a eliminação eficiente de interferências espectrais e não espectrais [153]. Isso faz com que muitos autores busquem essa técnica para o controle desses metais em diversos tipos de amostras, uma vez que, conforme mostrado na Figura 7, baixos LDs podem ser alcançados, facilitando assim a determinação em níveis baixos de concentrações, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb).

Além dessas técnicas mais usuais para a determinação desses três elementos, a literatura ainda traz outras possibilidades, como por exemplo o uso da AFS [249] ou voltametria [250, 251]. Apesar disso, é a técnica de GF AAS que se credencia como sendo uma das mais utilizadas para o monitoramento desses metais em amostras de alimentos e entre outras, devido

as suas características positivas, sendo algumas já citadas anteriormente [153].

3.4.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

A GF AAS é uma técnica bastante conhecida e empregada para a determinação de metais e metaloides, pois suas características operacionais são ideais para diferentes análises químicas, o que se dá devido a grandes evoluções dessa técnica ao longo dos anos [105].

Os conceitos básicos da AAS já foram discutidos no primeiro capítulo desta dissertação (seção 3.2.2.), no qual foi possível conhecer o histórico desta técnica. Alan Walsh desenvolveu condições experimentais para AAS na década de 50, mostrando que se tratava de um campo promissor para análises de elementos metálicos. Isso veio a chamar a atenção do cientista russo Boris L'Vov, o qual confirmou a validade da técnica e dedicou-se com persistência na sua utilização e aperfeiçoamento, obtendo assim um espectrômetro de absorção atômica que utilizava um forno de grafite com atomização eletrotérmica. Seu experimento inicial utilizando GF AAS consistia no uso de um sal de NaCl para análise elementar, caracterizando assim um sistema adequado para análise direta de amostras no estado sólido [71-105]. A Figura 32 ilustra o primeiro equipamento de GF AAS criado e testado por L'Vov, no qual foi possível o desenvolvimento do seu trabalho, que consistia na deposição de uma amostra na superfície de um eletrodo móvel de grafite, sendo posteriormente introduzido em um tubo de grafite revestido com uma folha de tântalo e aquecido eletricamente. Isso fez com que fosse possível a atomização da amostra em uma única etapa, gerando assim uma nuvem atômica mais concentrada, que teve como consequência a obtenção de uma melhor sensibilidade com menor consumo da amostra. Isso foi um marco importante para a história da AAS, pois o sistema desenvolvido inicialmente por Walsh, que contava com um nebulizador para introduzir amostras para o processo de leitura instrumental, não gerava parâmetros na magnitude do que era alcançado por L'Vov e seu GF AAS [71-252].

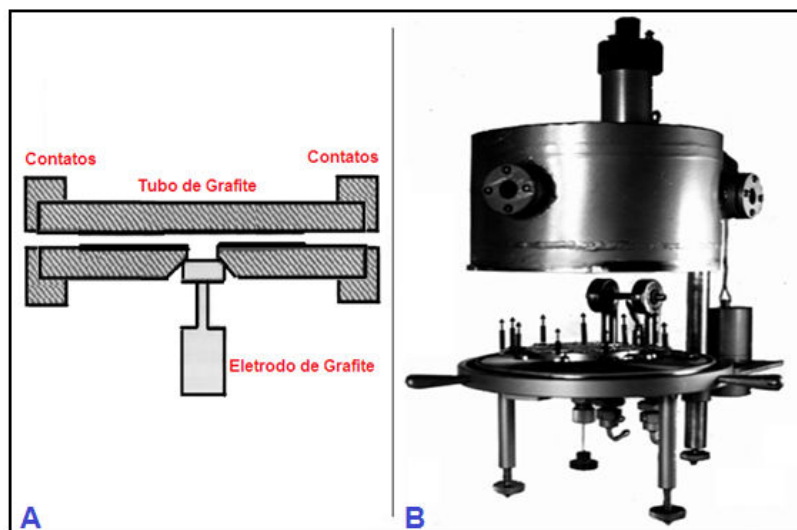


Figura 32 - Forno de grafite desenvolvido por L'Vov: (A) tubo de grafite esquemático e (B) Câmara com atomizador. Adaptado de Welz e Sperling [71].

O conceito da técnica de GF AAS apresentado por L'Vov foi melhor conhecido e compreendido em 1961, quando esse cientista publicou seu trabalho em uma revista científica denominada *Spectrochimica Acta* [253]. Ao longo dos anos, essa técnica foi sendo aperfeiçoada através de estudos, e em 1970 o primeiro instrumento de GF AAS foi introduzido no mercado pela empresa Perkin Elmer [71].

Hoje em dia, os equipamentos de GF AAS para análise de soluções é operado com o uso de um tubo de grafite cilíndrico e aberto nas duas extremidades, o qual possui um orifício central para a inserção da amostra por meio de uma micropipeta. Esse tubo é ajustado a um par de contatos elétricos cilíndricos de grafite localizados nas duas extremidades do tubo, sendo que esses contatos são mantidos em um suporte metálico e resfriado com água. Além disso, há também dois fluxos de gás inerte, sendo o fluxo externo o responsável por evitar a entrada de ar, o qual poderia incinerar o tubo, e o fluxo interno que serve para eliminar os vapores gerados pela matriz da amostra durante os estágios de aquecimento do forno [75]. A Figura 33 ilustra um esquema de GF AAS, no qual é possível verificar o posicionamento do tubo de grafite, bem como o sentido do fluxo interno e externo do gás inerte.

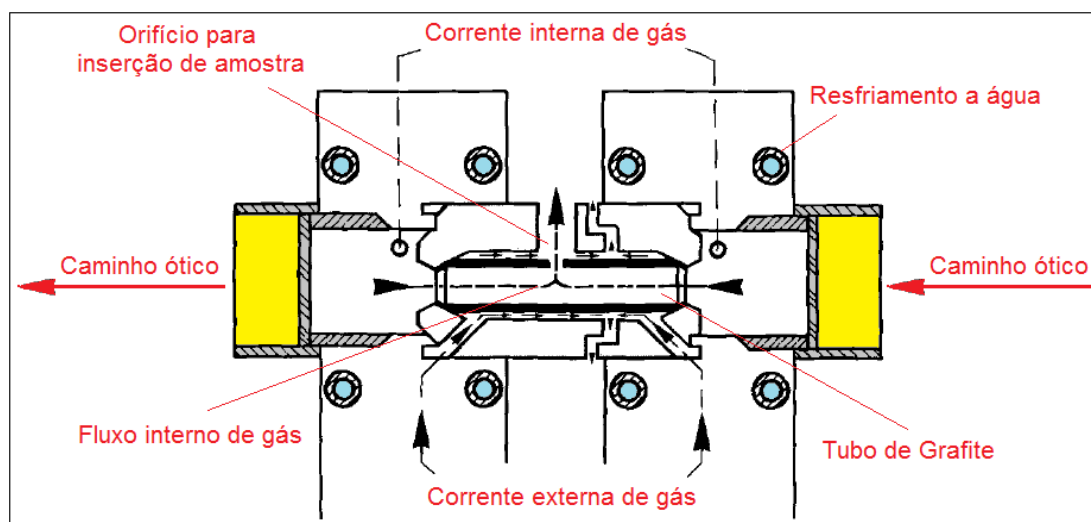


Figura 33 – Esquema de um forno de grafite. Adaptado de Welz e Sperling [71].

Logo em seguida da sua criação, L'Vov e demais pesquisadores da época constataram algumas dificuldades durante o processo de leitura instrumental, o que estava rendendo baixos sinais analíticos. Com isso, estudos apontaram que modificações deveriam ser feitas para melhorar tais sinais, como por exemplo a interrupção do gás inerte no interior do forno durante o momento da atomização. Além disso, L'Vov sugeriu a implementação de uma plataforma de grafite no interior do tubo, gerando assim uma maior homogeneidade durante o aquecimento interno. Isso fez com que houvesse uma diminuição em interferências químicas, pois a amostra é então colocada sobre essa plataforma que é aquecida gradualmente por meio da radiação vinda das paredes do tubo e, posteriormente, pelo gás aquecido. Esse aquecimento retardado da plataforma é vantajoso, uma vez que o analito não é atomizado até que o tubo e o gás atinjam uma temperatura final estável [71, 254].

O uso de tubos de grafite contendo plataforma (que ficou conhecida como plataforma de L'Vov) é importante para a obtenção de uma resposta analítica desejável, porém não é o único fator considerável para a realização de uma análise totalmente livre de interferências. As condições ideais para realizar uma análise em GF AAS foram estabelecidas por Walter Slavin em 1981, as quais ficaram conhecidas como o conceito STPF (*Stabilized Temperature*

Plataform Furnace) e encontram-se listadas na Tabela 10 [71, 74, 255, 256].

Tabela 10 – Condições ideais de GF AAS para atender às condições STPF. Adaptado de Correia e colaboradores [255].

Condições STPF	Observações
Uso da plataforma de L'Vov;	Aquecimento mais homogêneo do tubo durante a atomização;
Sinais de absorvância registrados em área, ao invés de altura;	Minimização dos efeitos das variações cinéticas do processo de atomização;
Uso de tubos revestidos com grafite pirolítico;	Redução de perdas por difusão através da parede do atomizador;
Aquecimento transversal do tubo de grafite;	Estabelecimento de um ambiente espacialmente isotérmico;
Uso de corretor de fundo eficiente;	Correções das interferências espectrais;
Uso de modificador químico;	Aumento da eficiência do tratamento térmico durante a etapa de pirólise;
Interrupção do fluxo de gás durante a etapa de atomização;	Aumento do tempo de residência da nuvem atômica no caminho ótico;
Elevada taxa de aquecimento do tubo de grafite durante as etapas;	Redução de interferências na fase vapor e formação de uma densa nuvem atômica;
Eletrônica rápida e adequada;	Obtenção do registro dos sinais de absorvância em tempo real.

Para o processo de determinação de metais em uma análise química por GF AAS, o conhecimento da natureza da amostra e as características físico-químicas do analito são de extrema importância, uma vez que assim é possível definir as melhores condições térmicas no procedimento de leitura instrumental. Sendo assim, para cada tipo de análise a ser realizada, é necessário adotar um programa de temperatura e tempo específico, o qual é composto de cinco etapas essenciais [71, 256]. A Figura 34 mostra um programa típico de aquecimento utilizado em GF AAS.

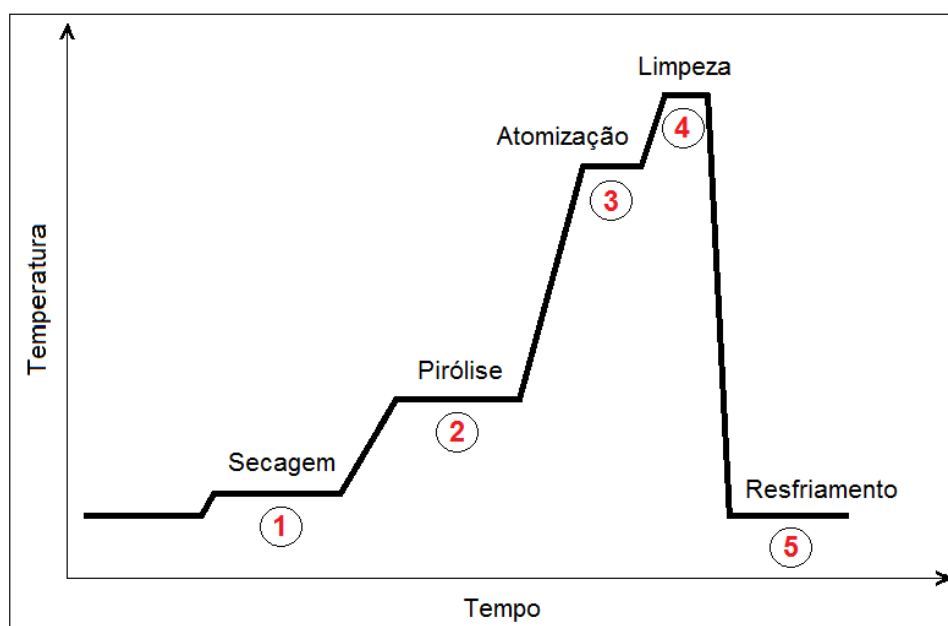


Figura 34 – Programa de temperatura de uma análise química por GF AAS. Adaptado de Lajunen e Perämäki [256].

Considerando as etapas do programa de temperatura e tempo citadas na Figura 34, a secagem tem como principal objetivo a eliminação do solvente presente na amostra, a qual deve ser efetuada de forma controlada de modo que a vaporização do solvente seja lenta e uniforme, pois um aquecimento brusco levaria à fervura da solução e consequentemente a perda de amostra pelas paredes do tubo, refletindo diretamente na diminuição da reprodutibilidade dos resultados. A etapa de pirólise é a responsável pela eliminação dos componentes da matriz, mas deve ser conduzida com extrema atenção, pois objetiva-se alcançar a máxima temperatura possível, mas sem eliminar o analito por volatilização. Dentre todas essas etapas, a mais importante em termos analíticos é a atomização, pois uma temperatura desejável é alcançada para a formação de uma nuvem atômica contendo o analito de interesse, com a qual é então possível gerar um sinal transiente que representa a quantidade do analito presente na amostra em análise. A etapa subsequente é a limpeza, na qual qualquer resquício da amostra é eliminado por meio do emprego de uma temperatura mais elevada, garantindo assim que não haverá efeito de memória nas posteriores leituras instrumental. A última etapa do programa é o resfriamento, onde ocorre a diminuição da temperatura até chegar ao estado ambiente, deixando assim o tubo de grafite pronto para

uma nova leitura [256].

A técnica de GF AAS vem apresentando muitas aplicações dentro do meio científico, pois entrando com as seguintes palavras chaves: “*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*” no campo de pesquisa do site de busca ScienceDirect, mais de dez mil artigos são oferecidos para consulta [257]. Toda essa aplicabilidade da técnica é devido à possibilidade de determinações de vários metais em diversos tipos de amostras, sejam elas no estado líquido, sólido ou gasoso. Um dos recentes destaques da literatura em GF AAS é a possibilidade de análise direta de sólidos, ficando assim conhecida como SS-GF AAS (do inglês *Solid Sample Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*). Essa alternativa de análise é de grande interesse dos cientistas, pois é possível destacar o aumento da frequência analítica, a menor manipulação das amostras e entre outras vantagens. Contudo, conforme já fora relatado no primeiro capítulo desta dissertação, algumas desvantagens estão relacionadas com essa técnica, o que leva a ser ainda muito atrativo o uso do método convencional de operação em GF AAS [105, 106].

A técnica de GF AAS em geral é muito destacável para a determinação de elementos, pois além das vantagens citadas até aqui, como baixos LDs, uso de pequenas quantidades de amostras (volumes de 10 a 50 μL) e possibilidade de análise direta de sólidos, essa técnica ainda conta com um maior tempo de residência da nuvem atômica no caminho ótico, o que tem por consequência uma maior sensibilidade do que quando comparado com o sistema de atomização em chama [74, 75, 257]. Contudo, uma desvantagem dessa técnica é a susceptibilidade a interferências advindas da matriz da amostra, podendo levar a um aumento no sinal do fundo na etapa de atomização [258]. Uma alternativa para contornar essa situação em uma análise por GF AS é o uso de sistemas corretores, os quais são responsáveis por medir a intensidade do fundo separadamente do sinal de absorvância total, que por subtração de ambos os valores é possível obter um sinal analítico livre de interferências. Para tal procedimento, existem quatro sistemas corretores disponíveis: fonte contínua, utilização do efeito Zeeman, utilização de corrente pulsada e medição próxima à linha analítica. Cada um desses corretores apresenta suas características para medir e corrigir o sinal de fundo em AAS, a fim de gerar um

sinal analítico mais limpo possível para as análises químicas [71].

Outra alternativa que também vem a contribuir para a diminuição de interferências é o uso de modificadores químicos, conforme fora citado no sexto item da Tabela 10, os quais mostram-se eficientes para tal objetivo, expandindo assim o número de estudos possíveis em termos de determinações de vários analitos por GF AAS [259].

3.4.2. Uso de modificadores químicos

A modificação química foi primeiramente proposta em 1975 por Ediger, o qual definiu esses modificadores como sendo uma substância química capaz de aumentar a estabilidade térmica do analito ou a volatilidade de componentes da matriz [71, 260]. Essa função dos modificadores é de extrema importância principalmente para a etapa de pirólise dentro de um programa de aquecimento do GF AAS, visto que assim é possível alcançar uma temperatura superior ao normal para esta etapa, o que reflete em uma remoção mais eficiente dos componentes da matriz da amostra e na liberação do analito para uma atomização livre de possíveis interferentes [259, 260].

Para um procedimento em GF AAS, a escolha do modificador químico é um fator importante, pois ele deve ser compatível com as condições estabelecidas para a análise. Segundo Schlemmer e Welz [261], um modificador químico ideal deve apresentar algumas características, tais como estabilizar o analito em temperaturas relativamente elevadas na etapa de pirólise, ser efetivo para um grande número de elementos químicos e para suas diferentes formas, ser disponível em um alto grau de pureza, não conter nenhum elemento que seja rotineiramente determinado em qualquer concentração, não deve reduzir o tempo de vida útil do tubo de grafite e não apresentar elevado sinal de fundo no momento de leitura instrumental. Contudo, ainda segundo esses autores, a maioria dos modificadores químicos não atende a todas essas expectativas citadas [261].

O uso de modificadores químicos para um procedimento experimental pode ocorrer de duas diferentes maneiras, sendo que a primeira é conhecida como o modo convencional, ou seja, o modificador químico está presente em

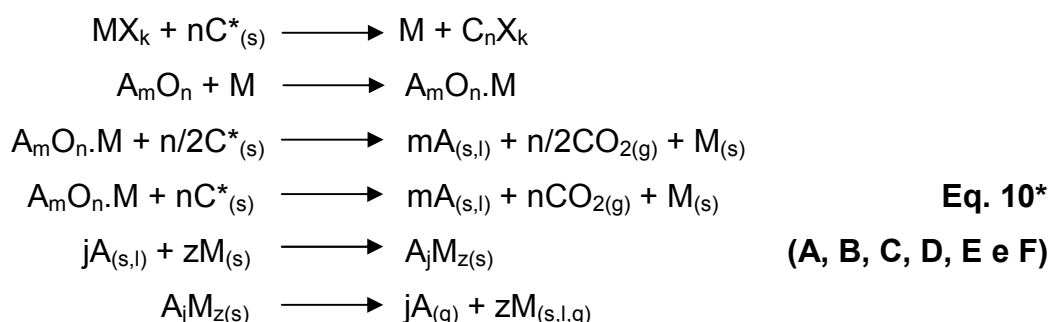
solução e é adicionado antes, depois ou juntamente com a amostra. A outra forma é a modificação permanente, na qual o modificador é impregnado previamente na superfície da plataforma do tubo de grafite antes desse receber a amostra para análise [259, 262]. Considerando o uso de modificador permanente, esse processo de impregnação pode ocorrer por meio de umedecimento da plataforma do tubo com uma solução modificadora, por eletrodeposição do elemento químico ou por deposição térmica do metal na superfície do tubo de grafite. Dentre essas três alternativas, a mais utilizada é a deposição térmica, pois é conduzida pelo próprio programa do GF AAS e não recobre totalmente a superfície da plataforma [259].

De acordo com a literatura, é possível conhecer uma série de modificadores químicos que podem ser usados para análises em GF AAS, sendo alguns mais empregados para o modo convencional e outros como permanentes [263-265]. Segundo Froes e colaboradores [259] os principais elementos utilizados como modificadores convencionais são o Cu, Ni, Pd/Mg(NO₃)₂, ácido cítrico e entre outros. Já como modificadores permanentes, esses autores citam os elementos do grupo da platina (Pd, Pt, Ir, Ru e Rh) e os formadores de carbetos (Zr, W, Nb e Ta), bem como uma mistura entre todos estes citados. Dentre essas soluções utilizadas, em 1986 Schlemmer e Welz [261] caracterizaram a mistura Pb/Mg(NO₃)₂ como sendo ideal para se utilizar em procedimentos experimentais. Alguns anos mais tarde (em 1992), Welz e colaboradores [266] utilizaram essa mistura para a determinação de 21 elementos, mostrando ser eficiente principalmente para a etapa de pirólise, onde foi possível obter uma temperatura superior e melhor remoção da matriz antes do analito ser atomizado. Essa mistura ficou então conhecida como “modificador universal”, sendo muito utilizada em diversos estudos [267-269].

A literatura reporta muito bem a ação dos modificadores químicos em uma análise, porém um melhor entendimento pode ser alcançado por meio de mecanismos, os quais tratam-se de estudos extremamente importantes. Considerando uma solução de Pd(NO₃)₂ como modificador, Qiao e Jackson [270] em 1991 apresentaram uma proposta de mecanismo, o qual consiste na redução do Pd a sua forma metálica, na etapa de pirólise, com a posterior

formação de uma liga estável entre o metal modificador e o analito, suportando assim temperaturas elevadas durante essa etapa de aquecimento. Subsequentemente, a liberação do analito ocorre para que esse possa ser quantificado na etapa de atomização. Contudo, segundo esses autores, quando utilizado apenas essa solução modificadora, há uma difusão muito lenta do analito para fora da camada de Pd formada, o que reflete um sinal de absorvância mais alargado na etapa de atomização. Isso não foi observado tão acentuadamente quando os autores utilizaram uma mistura entre Pd+Mg como modificador, o que se deve a uma distribuição mais uniforme da camada modificadora sobre a superfície do tubo de grafite, resultando em uma difusão mais rápida do analito e, conseqüentemente, na produção de um sinal de absorvância mais estreito [270].

Em um estudo realizado em 1996, Volynsky [271] mostra uma série de possíveis reações químicas para a ação dos modificadores do grupo da platina. as quais encontram-se expressas na Equação 10.



Para as reações químicas da Equação 10, M representa o modificador, A é o analito, X o íon ligado ao elemento modificador (como por exemplo, NO_3^- , Cl^- e entre outros), C^* os sítios ativos na superfície do tubo de grafite, k, m, n, j e z são coeficientes estequiométricos.

A proposta de mecanismo feita por Volynsky [271] tem as suas semelhanças com a de Qiao e Jackson [270], pois em ambos os estudos os autores descrevem que há uma ligação estável formada a partir do elemento modificador, na sua forma metálica, com o analito a ser determinado (Equação 10, etapa E). Em seguida essa ligação se desfaz e, então, o analito está liberado para ser quantificado conforme o programa de temperatura

* Adaptado de Volynsky [266].

estabelecido no procedimento de análise (Equação 10, etapa F).

Para a determinação de Cd, Pb e Sn, Volynsky [265] relata em seu estudo uma série de alternativas para se utilizar como modificadores, tanto pelo modo convencional como permanentes. Apesar disso, o autor cita o uso da mistura Pd+Mg como modificador comum para a determinação dos três elementos citados, visto que com esta mistura os resultados mostraram-se satisfatórios. Além da escolha de qual o melhor modificador, a atenção também deve ser voltada para uma etapa anterior a de leitura instrumental, a qual trata-se do preparo das amostras que serão analisadas, visto que o estado da amostra vai contribuir para o andamento da análise química [272].

3.5. Avaliação de métodos de preparo de amostras

Conforme já comentado no primeiro capítulo desta dissertação, a etapa de preparo de amostra pode ser considerada como uma das mais importantes dentro da sequência analítica. Um dos fatores que elevam o nível de importância desta etapa é avaliar qual o melhor procedimento a ser adotado em cada análise química, visto que essa tarefa não é fácil diante de muitos procedimentos que são trazidos na literatura [15]. Informações bastante detalhadas sobre a etapa de preparo de amostra já foram discutidas em toda a seção 3.3. do primeiro capítulo. Contudo, nesta seção serão considerados os procedimentos mais empregados de preparo de amostra para análises em GF AAS, principalmente para o tratamento de amostras de natureza biológica.

Um dos métodos bastante empregados para o tratamento de amostras é a decomposição ácida, o qual envolve a adição de um ácido mineral oxidante adequado e energia para que a amostra passe por uma transformação química [13]. A literatura traz muitos trabalhos que envolvem diferentes procedimentos de decomposição de amostras para determinação de metais pela técnica de GF AAS [273-275]. Em um estudo de revisão, Sardans e colaboradores [275] apontam uma lista com 143 trabalhos científicos que relatam a determinação de diversos elementos em matrizes biológicas por GF AAS. Dentre todos os trabalhos citados pelo autor, a grande maioria envolve processos de decomposição ácida por via úmida no tratamento das amostras. Já os demais

trabalhos tratam-se de procedimentos como calcinação, lixiviação, diluição, amostragem direta de sólidos ou a formação de suspensão [275].

Processos de solubilização, seja em meio ácido ou básico, também são atrativos dentro da etapa de preparo de amostras, visto que na maioria das vezes trata-se de um procedimento simples e seguro [108]. Considerando tal processo em meio alcalino, a literatura reporta em muitos estudos o uso de TMAH para amostras biológicas e determinação de metais por GF AAS [110, 155, 276]. Além desse reagente, também é possível empregar outros reagentes básicos para o tratamento de amostras, tais como as aminas terciárias solúveis em água (CFA-C) e reagentes fortemente alcalinos (NaOH, KOH, entre outros) [108]. Já em meio ácido, o processo de solubilização de amostras biológicas pode se dar com o uso de HCOOH, o qual vem apresentando resultados satisfatórios para análises em espectrometria atômica, incluindo GF AAS [159].

Diante de muitas alternativas para o preparo de amostras, muitos pesquisadores buscam a fundo as potencialidades de um determinado procedimento e acabam adotando-o para seu estudo. Contudo, é interessante o emprego de mais de um procedimento, a fim de compará-los diante das mesmas condições de análises. Recentemente, Nunes e colaboradores [110, 188] publicaram dois trabalhos envolvendo procedimentos de decomposição ácida e solubilizações com TMAH e HCOOH. Nestes estudos, os autores avaliaram a concentração de diferentes metais em amostras de carnes reais através da técnica de espectrometria atômica (F AAS e GF AAS), onde em ambos os estudos, os autores concluem sobre a eficiência e simplicidade do uso de TMAH para tal etapa de preparação de amostras biológicas.

3.5.1. Solubilização alcalina com TMAH

O TMAH é uma base orgânica forte (pH entre 13,4 a 14,7) solúvel em água e alcoóis, o que leva à formação de uma solução incolor e com odor característico de amina. Sua fórmula química é $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$, com massa molar de $91,15 \text{ g mol}^{-1}$, e encontra-se comercialmente vendida na forma de uma solução aquosa ou alcoólica com concentração de 25 % (m/v), a qual é estável a temperatura ambiente [108, 156]. Com relação aos efeitos desse reagente a

saúde humana, ele pode apresentar um nível considerado de toxicidade, o que reflete em maiores cuidados ao manipular tal reagente, pois seus vapores podem causar irritações nas vias respiratórias e a exposição dérmica pode levar a efeitos adversos [108, 277]. Lee e colaboradores [278] descrevem em seu estudo de revisão dois casos fatais de exposição dérmica com TMAH, onde ambas as vítimas apresentaram sintomas comuns como queimaduras de terceiro grau e problemas respiratórios e cardíacos. Além disso, os autores ainda trazem indicações de letalidade, onde testes com a finalidade de expor a pele de ratos a soluções de TMAH em concentrações de 2,38 e 25 % (m/v) foram realizadas e registrando resultados de 85,9 e 28,7 mg kg⁻¹ para LD₅₀ (que significa a dose letal capaz de matar 50 % dos indivíduos de uma população em teste), respectivamente. Para fins de comparação, testes com a injeção subcutânea dessas soluções de TMAH também foram realizados e os resultados observados para LD₅₀ foram de 12,9 e 11,9 mg Kg⁻¹, respectivamente.

O uso desse reagente no preparo de amostras para espectrometria atômica vem sendo utilizado já faz alguns anos. Um dos primeiros trabalhos foi publicado em 1973 por Murthy e colaboradores [279], onde esses autores solubilizaram amostras de fígado, rim e cabelo de rato para a determinação de Zn, Cu, Cd e Pb por F AAS. Nesta mesma década, mais especificamente em 1979, Julshamn e Andersen [280] utilizaram TMAH para solubilizar amostras de músculo humano obtidos em biopsias para a determinação de Cu, Cd, Mn e Al pela técnica de GF AAS. Segundo esses autores, o procedimento envolvendo o meio alcalino mostrou-se ineficiente apenas para a quantificação de Al nas amostras em questão. Desde então, muitos trabalhos até a atualidade vem sendo apresentados com o uso desse reagente alcalino para o preparo de diversos tipos de amostras. Recentemente, Nóbrega e colaboradores [108] publicaram um artigo de revisão mostrando a grande aplicabilidade do TMAH, no qual é possível ter acesso a uma tabela que detalha o procedimento de preparo de amostras envolvendo tal reagente para uma série de estudos.

Considerando o procedimento experimental, as amostras de natureza biológicas são facilmente solubilizadas com TMAH em temperatura ambiente, ou seja, não há necessidade do emprego de algum tipo de energia para o

aquecimento. As soluções resultantes apresentam uma característica de suspensão, as quais são capazes de permanecer estáveis durante meses, mesmo quando acondicionadas em temperatura ambiente [156]. De acordo com a literatura, muitos procedimentos experimentais diferem-se na quantidade em volume do TMAH necessário para o tratamento da amostra, visto que isso é um fator importante de se avaliar a fim de evitar possíveis interferências não espectrais. Contudo, uma proporção atrativa para o preparo de amostras biológicas e que vem sendo aplicada em outros estudos, foi relatado em 2005 por Torres e colaboradores [17], os quais descrevem que para cada miligrama de amostra seca são necessários 5 μL da solução 25 % (m/v) de TMAH para uma solubilização efetiva. Ainda sobre este estudo, os autores afirmam que em apenas duas horas já é possível obter uma solubilização das amostras em temperatura ambiente. Entretanto, é possível diminuir ainda mais esse tempo de tratamento das amostras, através do auxílio de aquecimento em sistema aberto com bloco digestor [281], em banhos ultrassônicos [282], assistido por micro-ondas [283] e entre outros. Em todos esses procedimentos envolvendo o auxílio de sistemas para aquecimento, o tempo de solubilização é acelerado e sendo inferior à uma hora.

De um modo geral, o processo de tratamento de amostras biológicas com TMAH apresenta vantagens destacáveis como simplicidade, rapidez e segurança, pois tal prática pode ser realizada em um frasco fechado sem risco de contaminação ou qualquer perda de analito por volatilização. Além disso, é possível acompanhar na literatura muitos trabalhos que trazem resultados satisfatórios para análises de amostras solubilizadas com este meio alcalino [108]. Contudo, como desvantagem desse reagente é possível citar o forte odor e a alta viscosidade da solução resultante, o qual pode vir a influenciar no processo de leitura instrumental. Além disso, para análises utilizando a técnica de GF AAS, é necessário o emprego de um modificador químico compatível com o meio alcalino de TMAH, pois assim é possível evitar problemas como formação de precipitados no interior do tubo de grafite e geração de um sinal analítico indesejável [108, 156].

3.5.2. Solubilização ácida com HCOOH

O HCOOH é um ácido orgânico relativamente fraco ($pK_a = 3,77$) de baixa massa molecular ($45,025 \text{ g mol}^{-1}$), incolor e com odor característico pungente. Comercialmente pode ser encontrado nas concentrações de 85 % (v/v) até aproximadamente 98 % (v/v), mas também pode ser facilmente purificado através de um destilador subebulição. Esse reagente permanece estável à temperatura ambiente e ao ar, sob condições normais de uso e armazenamento, mas é sensível à luz, ao calor e à umidade. Em relação a exposição humana, deve-se ter uma atenção ao manipular o respectivo ácido, uma vez que pode ser absorvido pelas vias oral, dérmica e inalatória, apresentando irritabilidade local e, possivelmente, o desenvolvimento de sintomas sistêmicos [284-285].

O uso desse ácido orgânico vem se destacando em diversas aplicações na etapa de preparo de amostras, principalmente na solubilização de materiais biológicos para posterior determinação de metais [19, 157, 158]. Como procedimento experimental, o uso de HCOOH é semelhante ao descrito para o TMAH, pois é realizado com a adição do ácido sobre a amostra e deixando em repouso até a formação de uma solução com característica de suspensão. Entretanto, a proporção de ácido em relação à quantidade de amostra biológica é descrita por Scriver e colaboradores [159], os quais relatam que para um grama de amostra seca, são necessários 40 mL desse reagente. Nesse estudo, os autores determinaram 15 elementos metálicos em amostras de tecidos biológicos marinhos por GF AAS e ICP OES, após a comparação entre o procedimento utilizando HCOOH para a solubilização e uma digestão ácida convencional assistida por micro-ondas, apresentando resultados satisfatórios para ambos os procedimentos adotados. Essa proporção descrita também foi adotada por Kan e colaboradores [19], os quais determinaram a concentração de Hg total em amostras de tecido biológico. Se comparado com o procedimento envolvendo TMAH, é necessário um volume bem maior de HCOOH para a solubilização da mesma quantidade de amostra. Apesar disso, é possível chegar ao tratamento da amostra por ambos os procedimentos, mas obter diluições diferentes para as soluções, ou seja, a solução resultante em

meio ácido irá conter a amostra de uma forma mais diluída e, conseqüentemente, a concentração de todos os analitos ali presentes.

Ainda com respeito ao estudo realizado por Scriver e colaboradores [159], esses autores concluem algumas vantagens em se utilizar o ácido orgânico no preparo de amostra do que a utilização de TMAH para análises por GF AAS. Segundo eles, o HCOOH não exala um odor muito forte durante a execução do programa de aquecimento, além de não necessitar de uma limpeza frequente do tubo de grafite, conforme é requerido quando se utiliza o meio alcalino.

O uso desse ácido orgânico no preparo de amostras não é uma prática muito recente, pois em 1991 o pesquisador Von Piechowski realizou uma dissolução de óleos para análise de fósforo e outros elementos por ICP OES [286]. Até os dias atuais, novos estudos vem surgindo com aplicação de HCOOH no preparo de amostras, principalmente em estudos relacionados com a *photo-CVG* [8, 287], que trata-se de uma técnica de geração de vapor após as amostras serem expostas a radiação UV, conforme já fora citada no primeiro capítulo desta dissertação. Segundo Guo e colaboradores [69], ácidos orgânicos de baixa massa molecular tais como o ácido fórmico, acético, propiônico e malônico são capazes de gerar radicais por meio da radiação UV e obter resultados satisfatórios na redução dos analitos e geração de vapor.

Apesar da literatura não dispor um número tão elevado de estudos envolvendo HCOOH para a solubilização de amostras biológicas, esse procedimento caracteriza-se por possuir vantagens tão boas quanto às apresentadas para o processo envolvendo TMAH, pois com o ácido orgânico é também possível obter uma solubilização simples e segura [157]. Contudo, a solubilização em meio ácido é um processo mais demorado do que relatado para o emprego de TMAH, uma vez que Scriver e colaboradores [159] empregaram um banho ultrassônico a 50 °C para acelerar esse procedimento, chegando a um tempo final que variou de 2 a 4 horas. Já Tormen e colaboradores [157, 158] conseguiram reduzir esse tempo para uma hora, porém com a adição de 90 °C de temperatura em “banho-maria”.

3.5.3. Decomposição ácida

Para o processo de decomposição ácida, a literatura reporta muitos estudos envolvendo diferentes condições experimentais, tais como o meio oxidante e o sistema de aquecimento [15, 103]. Esse procedimento pode ser realizado tanto em sistemas aberto ou fechado, onde a escolha vai depender do tipo de análise química que será realizada [15]. Uma discussão bastante detalhada sobre esse processo que envolve a decomposição ácida de amostras biológicas foi apresentada no primeiro capítulo desta dissertação (seção 3.3.1.1), onde é possível obter a definição, vantagens e desvantagens desse método de tratamento de amostras.

Apesar disso, cabe salientar o uso de sistema com dedo frio conectados a tubos digestores convencionais, que proporciona uma digestão ácida com mínimas perdas de analitos e ácidos por volatilização. Esse sistema vem a ser uma alternativa viável ao modo convencional aberto de tratamento das amostras, além de ser de fácil manuseio e barato, quando comparado com sistemas fechados sofisticados [137]. A seção 3.3.1.2 (capítulo 1) traz uma revisão importante sobre esse sistema, mostrando as principais aplicações recentes. Dentre essas recentes aplicações, é importante avaliar os estudos que utilizaram tal sistema para decomposição de diferentes tipos de amostra e determinação de Cd e Pb por GF AAS [128, 129, 134, 135], onde em todos foi possível a obtenção de resultados satisfatórios. Para Sn não há registros do emprego desse sistema para decomposição das amostras e posterior análise por GF AAS.

De um modo geral, o processo de decomposição ácida contribui para uma análise menos suscetível a interferências por GF AAS, pois grande parte da matriz já é eliminada na etapa de preparo da amostra [288]. Isso se caracteriza como uma vantagem desse procedimento, visto que os processos de solubilizações acabam mantendo todos os componentes da matriz em solução. Apesar de cada procedimento apresentar suas limitações, nada impede de serem empregados para o tratamento de amostras, uma vez que deve ser realizado otimizações operacionais prévias, a fim de que as análises químicas sejam conduzidas da melhor maneira possível.

4. Materiais e Métodos

4.1. Instrumentação

Todas as medidas foram realizadas em modo área do pico no espectrômetro de absorção atômica modelo AA-6300 (Shimadzu, Japão), equipado com um forno de grafite com aquecimento longitudinal (modelo GFA-EX7i), um amostrador automático modelo ASC-6100, uma lâmpada de arco de deutério como corretos de fundo e lâmpadas de cátodo oco para cada elemento estudado (Hamamatsu Photonics K. K., Japão). Para todas as leituras instrumentais, foram utilizados tubos revestido de grafite pirolítico com plataforma de L'Vov (Shimadzu 65F191). Como gás suporte, foi utilizado Argônio com uma pureza de 99,996 % (Linde, Barueri, SP). Algumas condições de operação do espectrômetro estão listadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros operacionais para a determinação de Cd, Pb e Sn.

Condições de Trabalho	Elemento		
	Cd	Pb	Sn
Comprimento de onda (nm)	228,8	283,3	224,6
Fenda espectral (nm)	0,5	0,5	0,7
Corrente da lâmpada (mA)	8	10	20

Todas as amostras reais adquiridas em comércio local foram trituradas utilizando um mini-processador de alimentos (Black & Decker, Brasil) e pesadas em uma balança analítica Ohaus Adventurer modelo AR 2140 (Pine Brook, NJ, EUA) com uma resolução de 0,1 mg e máximo de tara de 210 g. Para o processo de decomposição ácida das amostras, foi utilizado um bloco digestor modelo MA-4025 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), adaptando um sistema com dedo frio para cada tubo de digestão, a fim de evitar perdas de analito e reagente por volatilização durante o aquecimento. Esse sistema com dedo frio, o qual fora desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, está descrito na parte experimental do primeiro capítulo desta dissertação e representado na Figura 16. No processo de solubilização das amostras, foi utilizado um banho

ultrassônico modelo S40H (Helmasonic, Alemanha), a fim de auxiliar no tratamento das amostras.

4.2. Reagentes e Materiais

Todos os reagentes utilizados no presente estudo foram de grau analítico. Para o preparo de todas as soluções, utilizou-se água de alta pureza, tratada em um sistema Direct-Q 3 de purificação (Millipore Corporation, Bedford, USA), com resistividade de 18,3 MΩ cm. Soluções de trabalho para Sn foram preparadas por diluições feitas a partir de uma solução estoque para AAS contendo 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Buchs, Alemanha). Para Cd e Pb, as soluções de trabalho foram obtidas de forma semelhante, a partir de soluções estoques que foram preparadas a uma concentração de 1000 mg L⁻¹ Tritisol (Merck, Darmstadt, Germany) em água deionizada. Como modificador químico foram usados uma solução de Pd 1000 µg L⁻¹ em HCl 5,1 % (m/v) e Mg 1000 µg L⁻¹ (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), pipetando um volume específico para cada uma das soluções durante as análises.

Para a etapa de preparo das amostras, os ácidos nítrico (Synth, Brasil) e fórmico (Vetec, Brasil), foram bidestilados abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Além desses, uma solução aquosa de 25 % (m/v) de hidróxido de tetrametilamônio pentahidratado (Sigma Aldrich, Alemanha) também foi utilizado para o tratamento das amostras.

Assim como descrito para o experimento do primeiro capítulo desta dissertação, toda a vidraria e materiais de laboratório, utilizados para o preparo das amostras e padrões, foram primeiramente limpos com água e detergente e subsequentemente imersos em uma solução de HNO₃ 10 % (v/v) por, pelo menos, 48 horas, sendo posteriormente lavados com água deionizada e secos antes de seu uso.

4.3. Amostras e procedimentos de preparo

Foram utilizadas para o desenvolvimento dos procedimentos propostos neste estudo, amostras processadas e enlatadas de carne bovina fatiada, salsicha e almôndega, bem como uma amostra de carne bovina *In Natura*, todas adquiridas em comércio local. As amostras foram lavadas com água deionizada, cortadas, trituradas em um processador comercial e logo após, homogeneizadas. Em seguida, foram armazenadas e estocadas a -16 °C em potes de plásticos previamente limpos e descontaminados. Para os devidos procedimentos de análise, as amostras foram naturalmente descongeladas minutos antes dentro dos frascos fechados para evitar acúmulo de umidade antes das pesagens.

Uma informação importante sobre essas amostras reais é o teor de umidade, uma vez que isso pode influenciar na quantidade de reagente adicionado para o tratamento da amostra em seu estado seco. Sendo assim, aproximadamente 1 g de todas as amostras foi pesado em vidro de relógio, as quais foram levadas diretamente para uma estufa a temperatura de aproximadamente 100 °C por no mínimo 2 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas da estufa e deixadas em um dessecador até chegarem à temperatura ambiente para proceder a pesagem das mesmas. Esse processo foi realizado até as amostras adquirirem peso constante, ou seja, até a certeza de que toda a massa relativa a umidade foi eliminada. Através disso, foi possível avaliar que o teor de umidade presente em todas as amostras ficou próximo dos 70 % (m/m), o qual será levado em consideração para os próximos procedimentos de preparo.

Para validar a metodologia proposta, os seguintes materiais de referência certificados (CRM) foram utilizados: DOLT-4 (fígado de peixe), DORM-3 (proteína de peixe) e TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), produzidos pelo National Research Council (NRC, Canadá); 8414 (músculo bovino), 2976 (tecido de mexilhão) e 1577C (fígado bovino), produzidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

Todas as amostras citadas, tanto as reais como os CRM's, foram preparadas em três diferentes meios, onde os procedimentos que envolvem

solubilização foram realizados para avaliar a exatidão do método proposto, que trata-se da decomposição ácida empregando o sistema com dedo frio. Todos esses procedimentos estão apresentados a seguir.

4.3.1. Procedimento 1: Mineralização com sistema de dedo frio

Para todas as amostras, aproximadamente 0,50 g foram pesados diretamente em frascos digestores com a posterior adição de 2,0 ou 4,0 mL de HNO_3 para a mineralização das amostras reais e CRM's, respectivamente. Em seguida, foi acoplado o sistema de dedo-frio a esses frascos e aquecidos a uma temperatura de 220 °C do bloco digestor por uma hora. Foram adicionados volumes diferentes de ácido devido à massa referente à umidade nas amostras reais, a qual deve ser desprezada no cálculo da adição dos reagentes. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, a solução resultante foi transferida para frascos volumétricos e o volume completado a 10,0 mL com água deionizada.

Para avaliar a concentração final das soluções resultantes da decomposição ácida com o sistema de dedo frio, foi realizada uma titulação com uma solução padronizada 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (Synth, SP, Brasil)

4.3.2. Procedimento 2: Solubilização com HCOOH

Neste procedimento, foi pesada a mesma massa de amostra utilizada no procedimento anterior, porém foram necessários 6,0 mL para a solubilização das amostras reais, uma vez que esta detém de apenas 30 % de massa seca. Tal proporção adotada segue a descrita por Scriver e colaboradores [159], a qual também foi empregada para a solubilização das CRM's, sendo então necessários 20 mL do ácido. Todas as soluções foram encaminhadas para um banho ultrassônico a uma temperatura de 60 °C por no mínimo três horas, a fim de acelerar o processo de solubilização. Ao final, as soluções das amostras reais e CRM's foram avolumadas a 10,0 e 30,0 mL, respectivamente, com água deionizada.

4.3.3. Procedimento 3: Solubilização com TMAH

A mesma quantidade de massa foi pesada diretamente em frascos volumétricos, com a posterior adição de 750 μL e 2,5 mL da solução aquosa de TMAH 25 % (m/v) para as amostras reais e CRM's, respectivamente. Todas as amostras foram deixadas em repouso por pelo menos 2 horas a temperatura ambiente. Subsequentemente, as soluções foram avolumadas a 10,0 mL com água desionizada, conferindo uma concentração final de 1,9 e 6,2 % (m/v) para as soluções de amostras reais e de CRM, respectivamente.

Após a realização dos três procedimentos descritos, foi possível obter soluções com diferentes características, conforme podem ser visualizadas na Figura 35.

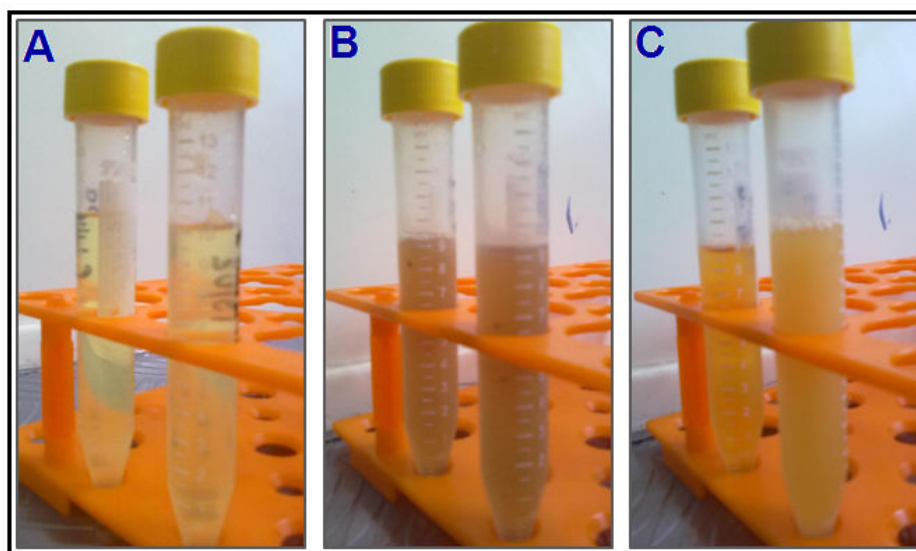


Figura 35 – Amostras biológicas tratadas por diferentes procedimentos. Decomposição ácida (A), solubilização com HCOOH (B) e solubilização com TMAH (C).

4.4. Metodologia

Conforme descrito anteriormente, as amostras foram submetidas a três diferentes procedimentos de preparo, as quais foram encaminhadas ao processo de leitura instrumental após a construção de curvas de calibração dos respectivos analitos. Essas curvas foram preparadas no mesmo meio em que

as amostras foram tratadas, a fim de minimizar ao máximo a diferença entre as soluções.

Para a determinação dos elementos em estudo, as amostras foram analisadas em triplicata, introduzindo 20 µL de cada solução da amostra no interior do tubo de grafite e submetendo a um programa de temperatura e tempo. As etapas de pirólise e atomização desse programa de temperatura, foram otimizadas para todos os meios de preparo das amostras e para os três analitos, a fim de garantir a melhor temperatura segura em cada etapa. Além disso, para garantir uma melhor eliminação da matriz na etapa de pirólise sem perda do analito por volatilização, foi avaliado o uso de modificador químico usando uma mistura de 5 µg de Pd + 3 µg de Mg, o qual foi adicionado a cada leitura dos padrões e amostras.

5. Resultados e Discussão

5.1. Otimização do programa de temperatura e tempo do GF AAS

Estudos para identificar a melhor temperatura das etapas de pirólise e atomização foram realizados, a fim de avaliar o melhor programa de aquecimento a ser adotado para a determinação de Cd, Pb e Sn em amostras biológicas. Para isso, foi adicionada uma quantidade conhecida dos analitos em meio aquoso e na presença de uma das amostras (carne bovina processada e enlatada), as quais foram tratadas por cada um dos processos de preparo de amostras citados (HNO_3 , HCOOH ou TMAH). Isso foi realizado com o intuito de obter um único programa de temperatura para cada analito, de modo a satisfazer todos os diferentes meios de tratamento de amostra empregados. Além disso, também foi estudado o uso do modificador universal, em uma proporção de 5 μg de Pd + 3 μg de Mg.

5.1.1. Otimização do programa para a determinação de Cd

O estudo realizado para a determinação de Cd está apresentado na Figura 36, na qual é possível avaliar o comportamento do sinal analítico para os três procedimentos de preparo das amostras. Estes estudos foram realizados em uma faixa de temperatura de 300 a 900 °C para a etapa de pirólise, enquanto que para a atomização variou de 900 a 2000 °C.

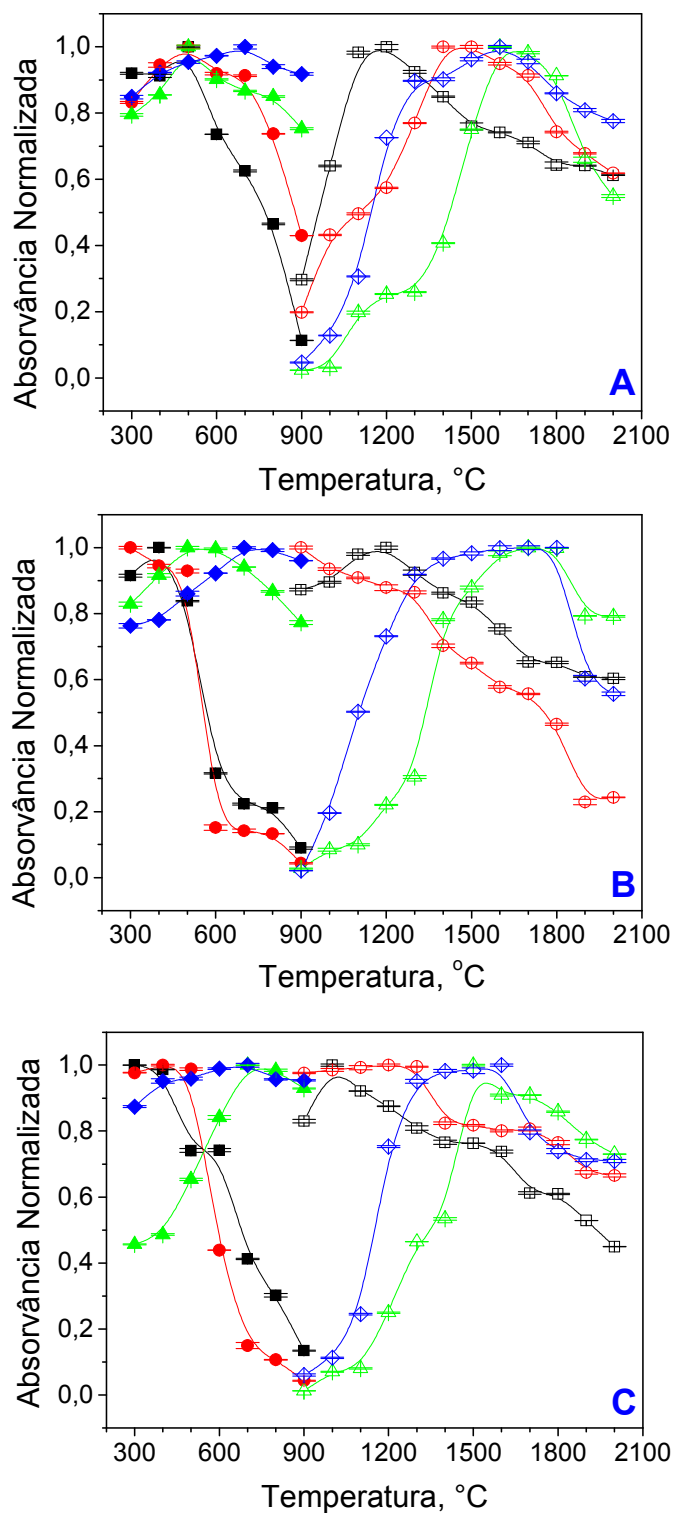


Figura 36 - Curvas de pirólise (sólido) e atomização (aberto) para $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd na presença de HNO_3 (A), HCOOH (B) e TMAH (C). Solução aquosa $(-\square-)(-\blacksquare-)$ e da amostra $(-\circ-)(-\bullet-)$ sem a adição de modificador químico e solução aquosa $(-\triangle-)(-\blacktriangle-)$ e da amostra $(-\diamond-)(-\blacklozenge-)$ com a adição de $3 \mu\text{g}$ de Mg + $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico.

De acordo com os gráficos apresentados na Figura 36, percebe-se que, para a etapa de pirólise, o sinal analítico tende a diminuir conforme o aumento da temperatura. Nesta etapa, um sinal mais intenso e comum para todos os meios foi de 600 °C, mas foi registrado para as curvas realizadas sem a adição de modificador químico. Para a etapa de atomização, um comportamento semelhante pode ser observado, uma vez que o sinal mais intenso registrado foi em temperaturas relativamente baixas.

Com a adição da mistura Pd + Mg como modificador químico, percebe-se um registro de sinal mais intenso em temperaturas mais elevadas, tanto para a etapa de pirólise quanto para atomização, resultando em temperaturas de 800 e 1600 °C, respectivamente, em todos os meios de preparo de amostras. Esse comportamento de maior resistência do analito a altas temperaturas garante uma maior eficiência de eliminação da matriz na etapa de pirólise, minimizando interferências na etapa de atomização.

Considerando todos os analitos estudados, esse estudo do programa de aquecimento foi avaliado para soluções aquosas e no meio da amostra, a fim de verificar uma temperatura ideal para uma melhor eliminação da matriz na etapa de pirólise sem haver diferenças significativas na intensidade do sinal analítico no meio aquoso. Com isso, é possível realizar uma calibração com soluções aquosas para a posterior análise das amostras biológicas.

Após avaliar os resultados obtidos no estudo apresentado na Figura 36, o programa de temperatura e tempo completo adotado para a determinação de Cd está apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 – Programa de temperatura e tempo utilizada para a determinação de Cd em amostras biológicas.

Etapa	Temperatura (°C)	Modo de Aquecimento	Tempo (s)	Vazão de Gás (L min⁻¹)
Secagem 1*	120	Rampa	20	0,1
Secagem 2*	250	Rampa	10	0,1
Pirólise 1*	300	Step	10	0,1
Pirólise 2	800	Step	10	0,1
Atomização	1600	Step	5	0
Limpeza	2200	Step	3	0,1

* Etapas e temperaturas recomendada pelo fabricante do equipamento.

Uma observação importante que cabe salientar na Tabela 12 é o modo de aquecimento, o qual pode se dar na forma de rampa, que atingirá a temperatura desejada ao final do tempo estabelecido, e a forma *step*, que manterá o forno na temperatura selecionada durante todo o tempo estabelecido.

5.1.2. Otimização do programa para a determinação de Pb

Para o estudo realizado para a determinação de Pb, o comportamento do sinal analítico em função da temperatura, tanto de pirólise como de atomização, foi semelhante ao observado para o Cd. Este estudo está apresentado na Figura 37, o qual foi realizado variando a temperatura de 300 a 1300 °C para a etapa de pirólise e de 1300 a 2300 °C para a atomização.

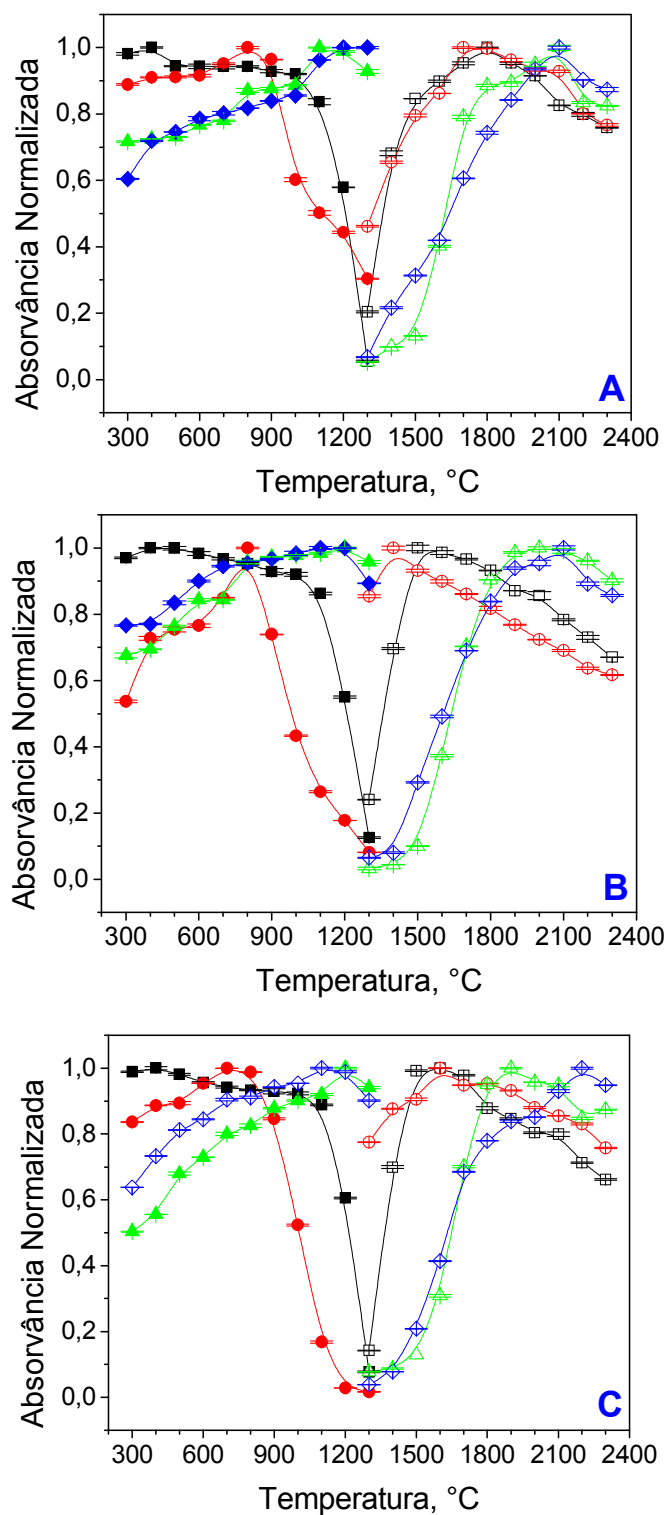


Figura 37 - Curvas de pirólise (sólido) e atomização (aberto) para $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb na presença de HNO_3 (A), HCOOH (B) e TMAH (C). Solução aquosa (-□-)(-■-) e da amostra (-○-)(-●-) sem a adição de modificador químico e solução aquosa (-△-)(-▲-) e da amostra (-◇-)(-◆-) com a adição de $3 \mu\text{g}$ de Mg + $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico.

De acordo com os gráficos referentes ao estudo de temperatura apresentado na Figura 37, percebe-se que é possível alcançar temperaturas mais elevadas para ambas as etapas quando se faz o uso de modificador químico. Sendo assim, as temperaturas adotadas foram 1100 e 2100 °C para a etapa de pirólise e atomização, respectivamente, uma vez que estas mostraram-se ideais para todos os meios de preparo das amostras. O programa de temperatura e tempo final para a determinação de Pb está apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 – Programa de temperatura e tempo utilizada para a determinação de Pb em amostras biológicas.

Etapa	Temperatura (°C)	Modo de Aquecimento	Tempo (s)	Vazão de Gás (L min⁻¹)
Secagem 1*	120	Rampa	20	0,1
Secagem 2*	250	Rampa	10	0,1
Pirólise 1*	300	Step	10	0,1
Pirólise 2	1100	Step	10	0,1
Atomização	2100	Step	5	0
Limpeza	2500	Step	3	0,1

* Etapas e temperaturas recomendada pelo fabricante do equipamento.

5.1.3. Otimização do programa para a determinação de Sn

O estudo para selecionar a melhor temperatura de pirólise e atomização também foi realizado para Sn, onde, conforme pode ser visualizado na Figura 38, o comportamento das curvas foi semelhante ao observado para os demais analitos. Para o referido analito, esse estudo foi realizado em uma faixa de temperatura que vario de 400 a 1500 °C e de 1800 a 2700 °C para as etapas de pirólise e atomização, respectivamente.

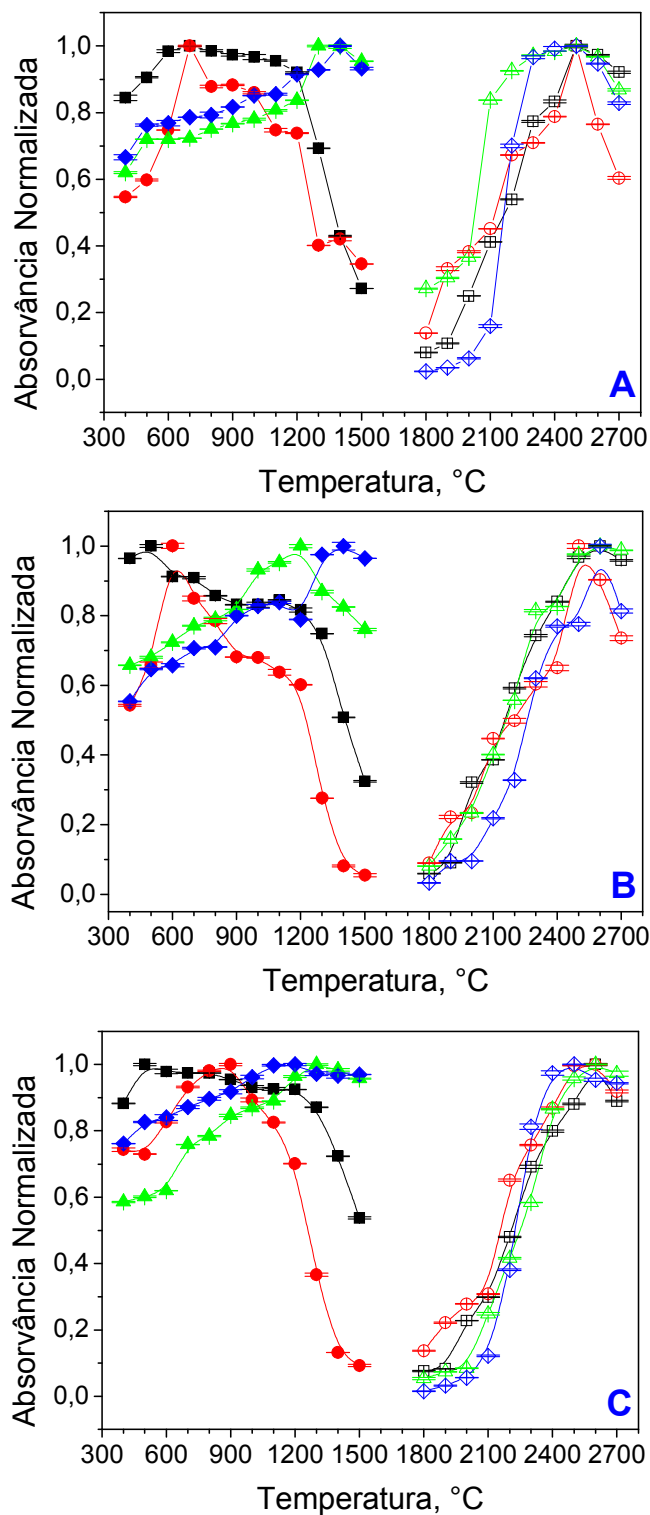


Figura 38 - Curvas de pirólise (sólido) e atomização (aberto) para $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sn na presença de HNO_3 (A), HCOOH (B) e TMAH (C). Solução aquosa (-□-)(-■-) e da amostra (-○-)(-●-) sem a adição de modificador químico e solução aquosa (-△-)(-▲-) e da amostra (-◇-)(-◆-) com a adição de $3 \mu\text{g}$ de Mg + $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico.

Para o estudo apresentado na Figura 38, é possível notar que a adição do modificador químico influencia positivamente na escolha de uma temperatura mais elevada, principalmente para a etapa de pirólise. Especificamente para esse analito, não houve diferenças muito significativas na intensidade do sinal analítico entre as soluções avaliadas para a etapa de atomização. Sendo assim, as temperaturas selecionadas após a avaliação do estudo apresentado foram 1400 e 2500 °C para a pirólise e atomização, respectivamente. O programa completo de aquecimento adotado para a determinação de Sn está apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 – Programa de temperatura e tempo utilizada para a determinação de Sn em amostras biológicas.

Etapa	Temperatura (°C)	Modo de Aquecimento	Tempo (s)	Vazão de Gás (L min⁻¹)
Secagem 1*	120	Rampa	20	0,1
Secagem 2*	250	Rampa	10	0,1
Pirólise 1*	300	Step	10	0,1
Pirólise 2	1400	Step	10	0,1
Atomização	2500	Step	5	0
Limpeza	2800	Step	3	0,1

* Etapas e temperaturas recomendada pelo fabricante do equipamento.

De um modo geral, os estudos realizados para selecionar a temperatura ideal para essas duas etapas são de extrema relevância, uma vez que essas podem ser consideradas as etapas mais importantes de um programa de aquecimento em GF AAS. Com isso, as temperaturas adotadas para os analitos em questão podem ser comparadas com outros estudos apresentados na literatura, como o de Azevedo e colaboradores [247], os quais empregaram temperaturas de 1300 e 2200 °C para a etapa de pirólise e atomização, respectivamente, na determinação de Sn em sangue e urina por GF AAS e utilizando modificador universal. Já para os demais analitos, Dessuy e colaboradores [151] estabeleceram a temperatura de 700 e 900 °C na etapa de pirólise e de 1300 e 2000 °C para atomização de Cd e Pb, respectivamente, na

análise de amostras de bebidas, na qual também foi utilizado o modificador universal para os procedimentos de leitura instrumental. A literatura ainda reporta estudos para a temperatura de pirólise e atomização em muitos outros trabalhos, os quais são utilizados para a determinação desses três analitos em diversos tipos de amostras ou utilizando outros tipos de modificadores químicos [150, 152, 248].

De acordo com as temperaturas citadas em estudos relatados na literatura, é possível notar que não há diferenças muito significativas para o valor estabelecido no presente trabalho e indicados nas Tabelas 12, 13 e 14. Apesar das condições de análises, como a natureza da amostra, não serem as mesmas, é possível ter uma ideia dos valores geralmente estabelecidos para essas etapas na determinação de Cd, Pb e Sn.

5.2. Parâmetros de Mérito

Para a determinação de Cd, Pb e Sn em amostras de carne, curvas de calibração foram construídas no mesmo meio de preparo das amostras e em um faixa linear específica para cada analito. Os parâmetros de mérito para o presente estudo estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros de mérito para a determinação de Cd, Pb e Sn em diferentes meios.

Analito	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Preparo de Amostra	a ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R
Cd	0,25 – 1,0	HNO ₃	0,1342	0,0006	0,0020	0,999
		HCOOH	0,1026	0,0008	0,0026	0,995
		TMAH	0,0804	0,0010	0,0034	0,998
Pb	5,0 – 30,0	HNO ₃	0,0042	0,0164	0,0546	0,995
		HCOOH	0,0037	0,0178	0,0594	0,998
		TMAH	0,0028	0,0224	0,0746	0,999
Sn	10,0 – 70,0	HNO ₃	0,0007	0,0520	0,1734	0,999
		HCOOH	0,0004	0,0660	0,2200	0,993
		TMAH	0,0006	0,0620	0,2066	0,997

De acordo com a Tabela 15, foi possível alcançar ótimos coeficientes de correlação linear nas curvas de calibração para todos os analitos ($R > 0,99$) e independente do método empregado para o preparo das amostras. Com relação a sensibilidade, a qual é dada pelo coeficiente de correlação angular das curvas de calibração (a), percebe-se que esse valor foi maior para o meio que utiliza HNO₃ no preparo de amostra. Com essas informações, é possível afirmar que o sistema de decomposição ácida, o qual faz o uso do eficiente sistema de dedo frio, é muito atrativo para o controle desses metais pela técnica de GF AAS. Além disso, o LD e LQ para este meio apresentaram-se menores do que quando comparado com os demais.

Considerando os outros dois métodos de preparo de amostras (HCOOH e TMAH), não foram registradas diferenças significativas para os parâmetros avaliados, fazendo com que esses métodos também possam ser empregados para o controle da concentração desses analitos. Para a determinação de Sn percebe-se uma sensibilidade baixa independente do método empregado para o tratamento das amostras, uma vez que a faixa linear empregada é relativamente alta, quando comparada com a dos demais elementos. Esse fato está diretamente ligado com o baixo sinal de absorvância registrado para esse

analito em concentrações baixas, o que faz com que seja necessário o emprego de uma faixa linear mais acentuada.

5.3. Efeito da temperatura de decomposição ácida das amostras

O efeito da temperatura na decomposição de amostras de carne foi estudado em função do sinal analítico na determinação de Cd, Pb e Sn, a fim de avaliar a eficiência do sistema de dedo frio no tratamento da amostra, bem como verificar se há algum risco de perdas de analito por volatilização durante essa etapa. Para isso, uma amostra real (carne bovina fatiada processada e enlatada) foi preparada em triplicata, conforme descrito no procedimento 1, porém com a adição de uma concentração conhecida dos analitos e levadas ao aquecimento em diferentes temperaturas do bloco digestor (de 100 a 220 °C). Para cada temperatura empregada foi verificado visualmente o término do processo por meio da coloração da solução resultante, o qual foi diminuindo conforme era aumentada a temperatura empregada no bloco digestor. A Figura 39 mostra este estudo realizado para o processo de tratamento das amostras biológicas.

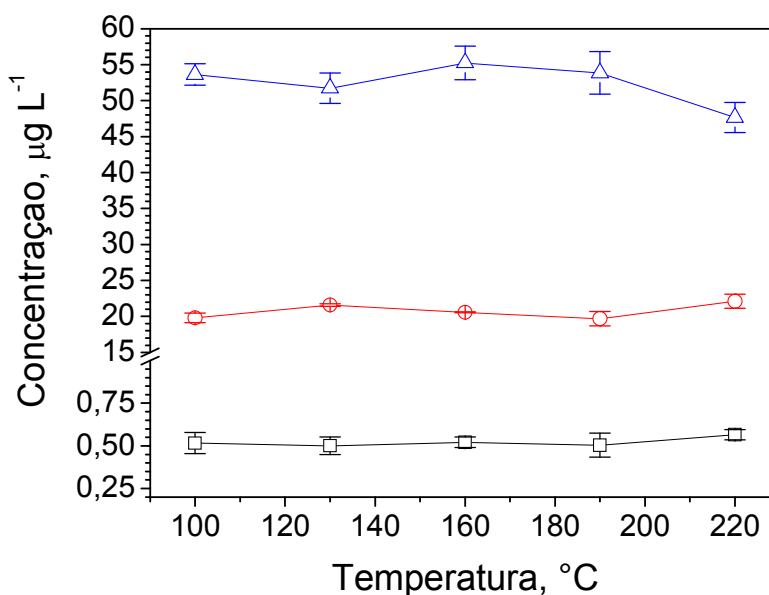


Figura 39 - Efeito da temperatura de mineralização de amostra biológica (carne bovina enlatada), em meio de HNO₃ e utilizando o sistema de dedo frio, para a determinação de 0,5 µg Cd L⁻¹ (-□-), 20 µg Pb L⁻¹ (-○-) e 50 µg Sn L⁻¹ (-△-).

Conforme verificado no estudo apresentado na Figura 39, não há diferenças significativas nas concentrações dos analitos adicionados às amostras, uma vez que boas recuperações foram obtidas em todas as temperaturas estabelecidas no bloco digestor para o processo de decomposição das amostras de carne. Por uma observação visual, foi verificado também que à medida que a temperatura de decomposição era aumenta no bloco digestor, o tempo gasto no processo era menor, uma vez que para a mineralização das amostras em 100 °C foram necessárias duas horas e meia, mas já para o mesmo processo em 220 °C foi preciso apenas uma hora para a realização do experimento. Esse estudo só foi possível de ser realizado devido ao sistema desenvolvido com acoplamento do dedo frio aos frascos de digestão, pois assim os vapores gerados durante o processo de aquecimento podem ser condensados, aproveitando ao máximo a capacidade de digestão do ácido utilizado. Com isso não há necessidade de reposição de ácidos durante o processo de mineralização, o que iria refletir em um aumento considerável dos brancos analíticos. Além disso, esse sistema de dedo frio opera à pressão atmosférica, o que garante uma maior segurança durante o processo, visto que não há risco de explosões por aumento da pressão interna nos frascos durante o aquecimento.

Quando fora estabelecido uma temperatura de 220 °C no bloco digestor (100 °C acima do ponto de ebulição do ácido empregado), percebeu-se uma diminuição no tempo de decomposição da matéria orgânica presente na amostras. Apesar da temperatura da solução não ultrapassar os 120 °C, conforme mostrado no estudo realizado no experimento do primeiro capítulo desta dissertação e apresentado na Figura 21, foi observado que a taxa de refluxo no interior do frasco era muito superior do que quando comparado com o emprego de temperaturas menores do que 220 °C. Possivelmente, isso também fez com que o processo de decomposição pudesse ser realizado em um menor tempo, contribuído também por uma maior turbulência que certamente propiciou uma melhoria cinética nas reações de decomposição. O sistema de dedo frio mostrou-se muito eficiente ao ponto de não registrar perdas significativas no volume de ácido inicialmente adicionado, mantendo os analitos estáveis sem perdas por volatilização.

Diante da eficiência no tratamento das amostras, a temperatura de 220 °C em um período de uma hora foi fixada para a realização do processo de decomposição de todas as amostras analisadas, caracterizando-se assim como um procedimento relativamente rápido e seguro para a determinação dos analitos em estudo.

O procedimento de titulação ácido/base foi realizado com uma solução de NaOH como titulante, com concentração aproximada de 0,1 mol L⁻¹ previamente padronizada com ftalato ácido de potássio (KHC₈H₄O₄), e o uso de uma solução de fenolftaleína 1 % (m/v) como indicador. Sendo assim, uma amostra real (carne bovina processada e enlatada) e um CRM (TORT 2 - hepatopâncreas de lagosta) foram tratados conforme descrito no procedimento 1 de preparo, sendo posteriormente encaminhadas para a titulação. Esse procedimento de decomposição ácida foi realizado utilizando o sistema com dedo frio e o convencional aberto, sendo possível assim avaliar eficiência do sistema proposto. Segundo os resultados obtidos, a concentração média de H⁺ encontrada nas amostras digeridas no sistema com dedo frio foi de 3,6422 mol L⁻¹, enquanto que para o convencional foi de 0,2316 mol L⁻¹. Essa grande diferença entre ambas as concentrações ácidas, aproximadamente 93 %, é devido ao emprego de temperatura elevada no bloco digestor (220 °C), o que levou a secura do frasco utilizado no sistema convencional aberto. Tal resultado mostra que com o uso do sistema proposto é possível evitar perdas significativas de ácido, além de não necessitar de reposição de volumes de ácido durante a digestões das amostras.

5.4. Resultados analíticos para a determinação de Cd, Pb e Sn em amostras de carne

A concentração de metais em produtos alimentícios enlatados pode variar conforme vários fatores, tais como a origem do alimento, o pH do produto enlatado, a qualidade da embalagem e o tempo de armazenamento [109]. Sendo assim, é de extrema importância o monitoramento de metais, principalmente de caráter tóxico, em alimentos, a fim de preservar a saúde do consumidor. Com isso, para obter informações com respeito à concentração de

Cd, Pb e Sn em amostras reais de carne, foram empregados os três procedimentos citados para o tratamento das mesmas e os resultados obtidos estão listados na Tabela 16. Conforme os resultados obtidos, a concentração encontrada para Cd e Pb em todas as amostras reais analisadas ficou abaixo do LD, ou seja, não pode ser detectado e/ou quantificado com uma apropriada certeza. Já para a concentração de Sn, foi encontrada uma concentração relativamente baixa, mas acima do LD em duas das amostras processadas e enlatadas. Esse elemento possivelmente se faz presente nas amostras analisadas, devido à composição do recipiente onde a amostra é comercializada.

Tabela 16 - Resultados analíticos para Sn em amostras reais de carne após diferentes procedimentos de preparo e determinados por GF AAS, ($n = 3$).

Amostra	Valor Encontrado, $\bar{x} \pm \text{SD}$, mg Kg ⁻¹		
	(RSD, %)		
	HNO ₃	HCOOH	TMAH
Salsicha	0,2616 $\pm$ 0,0033 (1,1)	0,2407 $\pm$ 0,0182 (7,5)	0,2470 $\pm$ 0,0308 (12,6)
Almôndega	1,5710 $\pm$ 0,0738 (4,7)	1,6390 $\pm$ 0,1176 (7,2)	1,6158 $\pm$ 0,0868 (5,4)

Os valores de concentração encontrados em duas amostras reais de carne não apresentam riscos ao consumo humano, uma vez que encontram-se abaixo do limite máximo imposto pela UE, que trata-se de 200 mg Kg⁻¹ de Sn em alimentos enlatados em geral. Para essas concentrações de Sn detectadas nas amostras de carnes, foi aplicado o teste estatístico t pareado para um limite de confiança de 95 %, pelo qual foi possível verificar que não há diferenças significativas entre os resultados encontrados para a concentração desse analito em todos os meios de tratamento das amostras.

Para fins de validação dos procedimentos empregados, testes de adição e recuperação dos analitos foram realizados para todos os meios de tratamento das amostras. Concentrações de 0,5, 20 e 50 µg L⁻¹ para Cd, Pb e Sn respectivamente, foram adicionadas a todas as amostras reais de carne estudadas. A Tabela 17 mostra os valores em concentração obtidos após as leituras em triplicata para cada caso avaliado.

Tabela 17 – Teste de adição e recuperação para Cd, Pb e Sn em amostras de carnes tratadas em diferentes meios de preparo, ($n = 3$).

Amostra	Valor Encontrado, $\bar{x} \pm SD$, $\mu\text{g L}^{-1}$ (RSD, %)		
	HNO ₃	HCOOH	TMAH
	<i>Adição de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd</i>		
A	0,5342 $\pm$ 0,0412 (7,7)	0,5373 $\pm$ 0,0352 (6,6)	0,4967 $\pm$ 0,0294 (5,9)
B	0,5089 $\pm$ 0,0338 (6,6)	0,4798 $\pm$ 0,0423 (8,8)	0,4828 $\pm$ 0,0323 (6,7)
C	0,5168 $\pm$ 0,0026 (0,5)	0,5364 $\pm$ 0,0366 (6,8)	0,5216 $\pm$ 0,0507 (9,7)
D	0,5082 $\pm$ 0,0200 (3,9)	0,4973 $\pm$ 0,0272 (5,5)	0,5147 $\pm$ 0,0254 (4,9)
Amostra	<i>Adição de 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb</i>		
	HNO ₃	HCOOH	TMAH
	<i>Adição de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sn</i>		
A	21,4985 $\pm$ 1,0219 (4,8)	18,8703 $\pm$ 1,3390 (7,1)	19,8259 $\pm$ 2,3460 (11,8)
B	20,6600 $\pm$ 0,1414 (0,7)	19,3032 $\pm$ 0,0765 (0,4)	20,4083 $\pm$ 1,7073 (8,4)
C	20,9109 $\pm$ 2,4047 (11,5)	18,7756 $\pm$ 0,4017 (2,1)	21,3125 $\pm$ 0,8396 (3,9)
D	21,8016 $\pm$ 2,2330 (10,2)	19,6278 $\pm$ 1,7598 (9,0)	19,5119 $\pm$ 2,2167 (11,4)
Amostra	<i>Adição de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sn</i>		
	HNO ₃	HCOOH	TMAH
	<i>Adição de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sn</i>		
A	47,6662 $\pm$ 2,1004 (4,4)	50,8286 $\pm$ 5,5957 (11,0)	51,5833 $\pm$ 5,6662 (11,0)
B	51,8166 $\pm$ 3,8867 (7,5)	50,3918 $\pm$ 2,7014 (5,4)	49,0102 $\pm$ 0,5303 (1,1)
C	47,6404 $\pm$ 4,0724 (8,5)	46,8463 $\pm$ 4,8194 (10,3)	47,1416 $\pm$ 4,3546 (9,2)
D	52,2500 $\pm$ 2,1213 (4,1)	53,2845 $\pm$ 5,0336 (9,4)	50,2917 $\pm$ 5,0381 (10,0)

Amostras: A = Carne Bovina Processada; B = Salsicha; C = Almôndega; D = Carne Bovina In Natura.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 17, é possível notar que foram obtidas boas recuperações para a concentração adicionada de cada analitos nas amostras reais. Contudo, essa recuperação pode ser melhor visualizada em termos de porcentagem, conforme está listada na Tabela 18, o qual mostra uma faixa de recuperação que variou de 93,7 a 109 %.

Ainda com base na Tabela 17, é possível perceber que o método que utiliza a decomposição ácida com sistema de dedo frio apresenta uma melhor precisão do que os demais métodos, uma vez que este apresenta uma média entre o RSD para os três analitos de 5,9 %, enquanto que os demais métodos

apresentaram médias de 6,9 e 7,8 % para HCOOH e TMAH, respectivamente.

Tabela 18 - Percentual de recuperação do teste de adição de analito.

Amostra	Recuperações* (%)								
	HNO ₃			TMAH			HCOOH		
	Cd	Pb	Sn	Cd	Pb	Sn	Cd	Pb	Sn
A	106,8	107,5	95,3	99,3	99,1	103,2	107,5	94,4	101,6
B	101,8	103,3	103,6	96,6	102,0	98,0	96,0	96,5	100,8
C	103,4	104,6	95,3	104,3	106,6	94,3	107,3	93,9	93,7
D	101,6	109,0	104,5	102,9	97,6	100,6	99,5	98,1	106,6

* Recuperações referente à adição de 0,5 µg L⁻¹ de Cd, 20,0 µg L⁻¹ de Pb e 50,0 µg L⁻¹ de Sn.

Amostras: A = Carne Bovina Processada; B = Salsicha; C = Almôndega; D = Carne Bovina In Natura.

Ainda no intuito de validar os procedimentos empregados para a determinação de Cd, Pb e Sn, diferentes CRM's foram utilizados e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados analíticos obtidos para Cd, Pb e Sn em CRMs tratados por diferentes procedimentos e determinadas por GF AAS, (n=3).

Amostras	Valor Cert. mg Kg ⁻¹ (x ± SD)	Valor Encontrado, $\bar{x} \pm SD$, mg Kg ⁻¹ (RSD, %)		
		HNO ₃	TMAH	HCOOH
		Determinação de Cd		
TORT-2	26,7 ± 0,6	26,4 ± 0,1 (0,4)	25,8 ± 0,5 (1,9)	27,8 ± 0,7 (2,5)
DORM-3	0,290 ± 0,020	0,305 ± 0,006 (2,0)	0,270 ± 0,011 (4,1)	0,288 ± 0,020 (6,9)
DOLT-4	24,3 ± 0,8	24,2 ± 1,9 (7,8)	23,8 ± 1,3 (5,5)	25,5 ± 2,0 (7,8)
8414	0,013 ± 0,011	0,009 ± 0,001 (11,1)	0,013 ± 0,001 (7,7)	0,015 ± 0,004 (26,7)
2976	0,82 ± 0,16	0,86 ± 0,09 (10,5)	0,84 ± 0,04 (4,8)	0,66 ± 0,03 (4,5)
1577C*	97,0 ± 1,4	97,4 ± 3,4 (3,5)	95,8 ± 4,4 (4,6)	98,4 ± 7,1 (7,2)
Determinação de Pb				
TORT-2	0,35 ± 0,13	0,41 ± 0,02 (4,9)	0,33 ± 0,01 (3,0)	0,34 ± 0,02 (5,9)
DORM-3	0,395 ± 0,050	0,405 ± 0,028 (6,9)	0,383 ± 0,004 (1,0)	0,342 ± 0,027 (7,9)
DOLT-4	0,16 ± 0,04	0,19 ± 0,01 (5,3)	0,15 ± 0,01 (6,7)	0,14 ± 0,01 (7,1)
8414	0,38 ± 0,24	0,48 ± 0,02 (4,2)	0,30 ± 0,02 (6,7)	0,32 ± 0,02 (6,2)
2976	1,19 ± 0,18	1,12 ± 0,06 (5,4)	1,19 ± 0,03 (2,5)	1,28 ± 0,05 (3,9)
1577C*	62,8 ± 1,0	64,0 ± 5,6 (8,8)	65,6 ± 2,2 (3,4)	59,3 ± 4,6 (7,8)

		Determinação de Sn		
TORT-2	Não Inf.	—	—	—
DORM-3	0,066 ± 0,012	0,055 ± 0,011 (20,0)	0,068 ± 0,013 (19,1)	<LD
DOLT-4	Não Inf.	—	—	—
8414	Não Inf.	0,692 ± 0,038 (5,5)	0,615 ± 0,088 (14,3)	0,626 ± 0,102 (16,3)
2976	0,096 ± 0,039	0,084 ± 0,035 (41,7)	0,067 ± 0,021 (31,3)	<LD
1577C*	Não Inf.	—	—	—

* Valor informado em $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Para os resultados apresentados na Tabela 19, também foi aplicado o teste estatístico t pareado para um nível de confiança de 95 %,o qual mostrou que não há diferenças significativas entre os valores encontrados para esses três analitos nos diferentes meios de tratamento das amostras de CRM's.

Assim como já mostrado no teste de adição e recuperação realizado e apresentado na Tabela 17, a exatidão dos procedimentos também pôde ser avaliada pela análise de CRM's. Os resultados encontrados para as concentrações dos analitos estudados ficaram dentro da faixa esperada e certificada. Isso mostra que qualquer um dos três procedimentos pode ser empregado com a garantia de uma boa exatidão para o controle desses metais em amostras de origem biológica. Com relação à precisão e tomando base os resultados da Tabela 19, é possível perceber que para a determinação de Cd e Pb em todas os CRM's, a média entre os RSDs para os três procedimentos de tratamento das amostras é inferior a 10 %, mostrando assim uma ótima precisão. Contudo, para a determinação de Sn essa média é superior aos 10 %.

De acordo com os valores certificados para Sn, nota-se que apenas duas das amostras informam os valores certificados. Contudo, para a amostra 8414 (músculo bovino) não foi informado esse valor certificado, porém foi possível a sua quantificação para todos os meios estudados. Tais concentrações de Sn encontradas para essa amostra também foram submetidas ao teste estatístico t pareado, o qual, em comparação entre os procedimentos empregados para o tratamento das amostras, o valor de t calculado é inferior ao t crítico para um nível de confiança de 95 %. Para as

demais amostras analisadas para a determinação de Sn (DORM-3 e 2976), não foi possível sua quantificação quando as amostras foram tratadas em meio de HCOOH, pois, como já mencionado anteriormente, as CRMs foram aferidas a um volume final de 30 mL, uma vez que se fez necessário um volume maior do ácido orgânico para o tratamento. Com isso, a concentração esperada para esse elemento acabou sendo diluída e o seu valor ficando inferior ao LD. Contudo, para os demais meios de tratamento das amostras, a quantificação desse elemento foi possível, visto que as amostras foram avolumadas a 10 mL.

6. Considerações Finais

Foram desenvolvidos três diferentes procedimentos de preparo de amostras para a determinação de Cd, Pb e Sn em amostras biológicas, os quais foram validados com resultados satisfatórios para a análise de amostras enriquecidas com os analitos, bem como com a análise de CRMs. Em comparação entre os procedimentos, bons resultados foram obtidos quando uma suspensão foi preparada, tanto com o uso de TMAH ou HCOOH. Contudo, uma maior sensibilidade e menores LDs foram obtidos quando se fez o uso de mineralização ácida com HNO₃, o que torna indispensável o emprego de tal procedimento para determinação de metais em amostras e determinação por GF AAS. Além disso, o TMAH apresenta um alto custo e grande risco à saúde do analista devido a sua toxicidade. Já em relação ao HCOOH, o volume necessário de reagente e o tempo gasto são muito inferiores para o método de digestão ácida, o que pode ser considerado mais um fator positivo para se empregar tal procedimento para o preparo de amostras biológicas.

O processo de mineralização ácida empregado nesse trabalho conta com um sistema de dedo frio, o qual mostrou-se eficiente em tal experimento. Foi possível ajustar uma temperatura no bloco digestor a 100 °C acima do ponto de ebulição do único ácido empregado, sem risco de haver perdas desse reagente por volatilização devido a condensação dos vapores gerados internamente. Esse sistema vem mostrando-se como uma ótima alternativa a sistemas mais sofisticados e fechados para mineralização ácida. Através dele é possível obter uma decomposição satisfatória da matéria orgânica sem perda de analito e reagente, além de caracterizar-se como um sistema barato e que pode ser empregado em qualquer laboratório de pesquisa e/ou análises de rotina. Com isso, novos estudos serão desenvolvidos, explorando mais o sistema de dedo frio desenvolvido para determinação de metais em diferentes tipos de matrizes.

O presente estudo gerou publicação em uma revista internacional denominada *Analytical Methods*, a qual pode ser visualizada no Anexo 2.

7. Referências Bibliográficas Gerais

- [1] Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. M. Metais: Gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Editora Atheneu, 2003, 554 p.
- [2] Bernhoft, R. A. Mercury toxicity and treatment: A review of the literature. *Journal of Environmental and Public Health*, v. 2012, 2012, 1-10.
- [3] Micaroni, R. C. C. M.; Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, v. 23, n. 4, 2000, 487-495.
- [4] Nascimento, E. S.; Chasin, A. A. M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. *Série Cadernos de Referência Ambiental*, v. 1, 2001, 176p.
- [5] Leopold, K.; Foulkes, M.; Worsfold, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 663, 2010, 127-138.
- [6] Takase, I.; Pereira, H. B.; Luna, A. S.; Grinberg, P.; Campos, R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. *Química Nova*, v. 25, 2002, 1132-1144.
- [7] Wu, P.; He, L.; Zheng, C.; Hou, X.; Sturgeon, R. E. Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 25, 2010, 1217-1246.
- [8] Bendicho, C.; Pena, F.; Costas, M.; Gil, S.; Lavilla, I. Photochemistry-based sample treatments as greener approaches for trace-element analysis and speciation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, n. 7, 2010, 681-691.
- [9] Gao, Y.; Shi, Z.; Long, Z.; Wu, P.; Zheng, C.; Hou, X. Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 103, 2012, 1-14.
- [10] Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M. Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, 2005, 383-393.
- [11] Balarama, M. V.; Ranjit, M.; Karunasagar, D.; Arunachalam, J. A rapid

ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CV AAS. *Talanta*, v. 67, 2005, 70–80.

[12] Torres, D. P.; Frescura, V. L. A.; Curtius, A. J. Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment. *Microchemical Journal*, v. 93, 2009, 206-210.

[13] Twyman, R. M. Sample dissolution for elemental analysis: Wet digestion. In: Worsfold, P.; Townshend, A.; Poole, C. *Encyclopedia of analytical science*, 2nd edition, v. 8, London: Elsevier Science, 2005, 146-153.

[14] Matusiewicz, H.; Stanis, E. Evaluation of high pressure oxygen microwave-assisted wet decomposition for the determination of mercury by CV AAS utilizing UV-induced reduction. *Microchemical Journal*, v. 95, 2010, 268–273.

[15] Krug, F. J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1^a edição, Piracicaba, 2010, 340 p.

[16] Burguera, J. L.; Burguera, M. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 64, 2009, 451-458.

[17] Torres, D. P.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J. Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 20, 2005, 289-294.

[18] Barbosa Jr., F.; Palmer, C. D.; Krug, F. J.; Parsons, P. J. Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 19, 2004, 1000-1005.

[19] Kan, M.; Willie, S. C.; Scriver, C.; Sturgeon, R. E. Determination of total mercury in biological samples using flow injection CV AAS following tissue solubilization in formic acid. *Talanta*, v. 68, 2006, 1259-1263.

- [20] Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; Sturgeon, R. E. Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 388, 2007, 837-847.
- [21] Voegborlo, R. B.; Adimado, A. A. A simple classical wet digestion technique for the determination of total mercury in fish tissue by cold-vapour atomic absorption spectrometry in a low technology environment. *Food Chemistry*, v. 123, 2010, 936-940.
- [22] Ebadian, M. A.; Allen, M.; Cai, Y. Mercury contaminated material decontamination methods: investigation and assessment. Hemispheric Center for Environmental Technology (HCET) – Final Report, Department of Energy, Miami, 2001, 61p.
- [23] Wang, J.; Feng, X.; Anderson, C. W. N.; Xing, Y.; Shang, L. Remediation of Mercury Contaminated Sites - A Review. *Journal of Hazardous Materials, In Press*, doi:10.1016/j.jhazmat.2012.04.035, 2012.
- [24] Pacyna, E. G.; Pacyna, J. M.; Sundseth, K.; Munthe, J.; Kindbom, K.; Wilson, S.; Steenhuisen, F.; Maxson, P. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections 2020. *Atmospheric Environment*, v. 44, 2010, 2487-2499.
- [25] Environmental Protection Agency. Mercury study report to congress. EPA-452/R-97-003, United States, v. 1, 1997, 95p.
- [26] Souza, J. R.; Barbosa, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Química Nova na Escola*, v. 12, 2000, 3-7.
- [27] Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. *Química Nova*, v. 27, 2004, 593-600.
- [28] Craig, P. J.; Morton, S. F. Kinetics and mechanism of the reaction between methylcobalamin and mercury chloride. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 145, 1978, 79-89.
- [29] United Nations Environment Programme (UNEP). Mercury in the aquatic environment: sources, releases, transport and monitoring. Division of Technology, Industry and Economics (DTIE), Geneva, 2011, 116p.
- [30] United Nations Environment Programme (UNEP). Study on mercury

sources and emissions and analysis of cost and effectiveness of control measures. Division of Technology, Industry and Economics (DTIE), Geneva, 2010, 70p.

[31] Pirrone, N.; Cinnirella, S.; Feng, X.; Finkelman, R. B.; Friedli, H. R.; Leaner, J.; Mason, R.; Mukherjee, A. B.; Stracher, G. B.; Streets, D. G.; Telmer, K. Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmospheric Chemistry and Physics*, v. 10, 2010, 5951-5964.

[32] Lacerda, L. D.; Santos, A. F.; Marins, R. V. Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. *Química Nova*, v. 30, 2007, 366-369.

[33] Leermakers, M.; Baeyens W.; Quevauviller P.; Horvat, M. Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, 2005, 383-393.

[34] Crespo-Lopez, M. E.; Macêdo, G. L.; Pereira, S.I. D.; Arrifano, G. P. F.; Picanço-Diniz, D. L. W.; Nascimento, J. L. M.; Herculano, A. M. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, v. 60, 2009, 212–220.

[35] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Fundamentos de química analítica. 8ª edição, Cengage Learning: São Paulo, 2011, 1000p.

[36] Akagi, H.; Akiba, S.; Arimura, K.; Satoh, H.; Togashi, S.; Naganuma, A.; Futatsuka, M.; Matsuyama, A.; Ando, T.; Sakamoto, M. Preventive Measures against Environmental Mercury Pollution and its health effects. Japan Public Health Association: Tokyo, 2001, 117p.

[37] Harada, M.; Nakanishi, J.; Yasoda, E.; Pinheiro, M. C. N.; Oikawa, T.; Guimarães, G. A.; Cardoso, B. S.; Kizaki, T.; Ohno, H. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon mercury level of head hair and health effects. *Environment International*, v. 27, 2001, 285–290.

[38] Akagi, H.; Malm, O.; Branches, F. J. P.; Kinjo, Y.; Kashima, Y.; Guimaraes, J. R. D.; Oliveira, R. B.; Haraguchi, K.; Pfeiffer, W. C.; Takizawa, Y.; Kato, H. Human exposure to mercury due to goldmining in the Tapajos River basin, Amazon, Brazil: speciation of mercury in human hair, blood and urine. *Water*,

Air, and Soil Pollution, v. 80, 1995, 85-94.

[39] Triunfante, P.; Soares, M. E.; Santos, A.; Tavares, S.; Carmo, H.; Bastos, M. L. Mercury fatal intoxication: two case reports. *Forensic Science International*, v. 184, 2009, e1–e6.

[40] Clarkson, T. W.; Magos, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 36, 2006, 609–662.

[41] Zahir, F.; Rizwi, S. J.; Haq, S. K.; Khan, R. H. Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, 2005, 351–360.

[42] Nevado, J. J. B.; Martín-Doimeadios, R. C. R.; Moreno, M. J.; Nascimento, J. L. M.; Herculano, A. M.; Crespo-López, M. E. Mercury speciation analysis on cell lines of the human central nervous system to explain genotoxic effects. *Microchemical Journal*, v. 93, 2009, 12–16.

[43] Oliveira, R. B.; Gomes-Leal, W.; Nascimento, J. L. M.; Picanço-Diniz, C. W. Methylmercury intoxication and histochemical demonstration of NADPH-diaphorase activity in the striate córtex of adult cats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.31, 1998, 1157-1161.

[44] Environmental Protection Agency. Technology Transfer Network Air Toxics Web Site: Mercury Compounds. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/mercury.html>>. Acessado em junho de 2012.

[45] Machado, A. Neuroanatomia funcional. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, 363 p.

[46] Nelson, D. L.; Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, 5nd edition, New York: W. H. Freeman and Company, 2008, 1158 p.

[47] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. Bioquímica, 6^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2008, 1114p.

[48] Ravichandran, M. Interactions between mercury and dissolved organic matter – a review. *Chemosphere*, v. 55, 2004, 319–331.

[49] Guzzi, G. P.; La Porta, C. A. M. Molecular mechanisms triggered by Mercury. *Toxicology*, v. 244, 2008, 1–12.

- [50] Cizdziel, J. V.; Gerstenberger, S. Determination of total mercury in human hair and animal fur by combustion atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 64, 2004, 918–921.
- [51] Gill, U. S.; Schwartz, H. M.; Bigras, L. Results of multiyear interlaboratory comparison program for mercury in human hair. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 43, 2002, 466–472.
- [52] Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Curtius, A. J. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. *Química Nova*, v. 22, 1999, 838-846.
- [53] Tsanaclis, L. M.; Wicks, J. F. C.; Chasin, A. A. M. Análises de drogas em cabelos ou pelos. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 4, 2011, 6 – 46.
- [54] World Health Organization (WHO). Exposure to mercury: a major public health concern. 2007, 4p.
- [55] Moreda-Piñeiro, J.; Moreda-Piñeiro, A.; Romarís-Hortas, V.; Domínguez-González, R.; Alonso-Rodríguez, E.; López-Mahía. P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D.; Barmejo-Barrera, P. Trace metals in marine foodstuff: bioavailability estimation and effect of major food constituents. *Food Chemistry*, v. 134, 2012, 339–345.
- [56] Commission regulation (EC) N0 1881/2006 of 19th December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Official Journal of the European Union*, n. L255, 01 of September of 2007, 1-24.
- [57] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Legislação: Portaria n ° 685, de 27 de agosto de 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm>. Acessado em julho de 2012.
- [58] López-Antón, M. A.; Díaz-Somoano, M.; Ochoa-González, R.; Martínez-Tarazona, M. R. Analytical methods for mercury analysis in coal and coal combustion by-products. *International Journal of Coal Geology*, v. 94, 2012, 44–53.
- [59] Suzuki, T.; Akagi, H.; Arimura, K.; Ando, T.; Sakamoto, M.; Satoh, H.; Naganuma, A.; Futatsuka, M.; Matsuyama, A. Mercury analysis manual.

Ministry of the Environment, Japan, 2004, 105p.

[60] Kot, A.; Namiesnik, J. The role of speciation in analytical chemistry. Trends in Analytical Chemistry, v. 19, 2000, 69-80.

[61] Morita, M.; Yoshinaga, J.; Edmonds, J. S. The determination of mercury species in environmental and biological samples. Pure and Applied Chemistry, v. 70, 1998, 1585-1615.

[62] Chasin, A. A. M.; Nascimento, E. S.; Ribeiro-Neto, L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; Andraus, M. H.; Salvadori, M. C.; Fernicola, N. A. G.; Gorni, R.; Salcedo, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Revista Brasileira de Toxicologia, v. 11, 1998, 1-6.

[63] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo, DOQ-CGCRE-08, 2010, 20p.

[64] PerkinElmer Instruments. Guide to atomic spectroscopy techniques and applications. 2000, 40 p.

[65] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resoluções: RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acessado em julho de 2012.

[66] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Analytical Chemistry Division: Commission on Spectrochemical and Other Optical Procedures for Analysis. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - II. Pure and Applied Chemistry, v. 45, 1976, 100-103.

[67] Long, G. L.; Winefordner, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. Analytical Chemistry, v. 55, 1983, 712 A-724 A.

[68] Serafimovski, I.; Karadjova, I.; Stafilov, T.; Cvetković, J. Determination of inorganic and methylmercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Microchemical Journal, v. 89, 2008, 42-47.

[69] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J. UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry. Analytical Chemistry, v. 75, 2003, 2092-2099.

- [70] Silva, C. S.; Oreste, E. Q.; Nunes, A. M.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S. Determination of mercury in ethanol biofuel by photochemical vapor generation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 27, 2012, 689-694.
- [71] Welz, B.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3rd edition, Wiley-Vch: Germany, 1999, 955p.
- [72] Walsh, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochimica Acta*, v. 7, 1955, 108-117.
- [73] Bings, N. H.; Bogaerts, A.; Broekaert, J. A. C. Atomic spectroscopy: a review. *Analytical Chemistry*, v. 82, 2010, 4653–4681.
- [74] Amorim, F. A. C.; Lobo, I. P.; Santos, V. L. C. S.; Ferreira, S. L. C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. *Química Nova*, v. 31, 2008, 1784-1790.
- [75] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de análise instrumental*. 6^a edição, Bookman: Porto Alegre, 2009, 1059p.
- [76] Krata, A.; Jędral, W.; Bulska, E. On the uniforming of the atomization process for inorganic and organic mercury in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 62, 2007, 269–272.
- [77] Krata, A.; Bulska, E. Critical evaluation of analytical performance of atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for mercury determination. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, 2005, 345– 350.
- [78] Sturgeon, R. E.; Mester, Z. Analytical applications of volatile metal derivatives. *Applied Spectroscopy*, v. 56, 2002, 202A-213A.
- [79] Hatch, W. R.; Ott, W. L. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, v. 40, 1968, 2085-2087.
- [80] Holak, W. Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, v. 41, 1969, 1712-1713.
- [81] Braman, R. S.; Justen, L. L.; Foreback, C. C. Direct volatilization-spectral emission type detection system for nanogram amounts of arsenic and antimony. *Analytical Chemistry*, v. 44, 1972, 2195-2199.

- [82] Luna, A. S.; Sturgeon, R. E.; Campos, R. C. Chemical vapor generation: atomic absorption by Ag, Au, Cu and Zn following reduction of aquo ions with sodium tetrahydroborate (III). *Analytical Chemistry*, v. 72, 2000, 3523-3531.
- [83] Ataman, O. Y. Vapor generation and atom traps: Atomic absorption spectrometry at the ng/L level. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 63, 2008, 825–834.
- [84] Pohl, P. Recent advances in chemical vapour generation via reaction with sodium tetrahydroborate. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, 2004, 21-27.
- [85] Åström, O. Flow injection analysis for the determination of bismuth by atomic absorption spectrometry with hydride generation. *Analytical Chemistry*, v. 54, 1982, 190-193.
- [86] Řužička, J.; Hansen, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 78, 1975, 145-157.
- [87] Robbins, W. B.; Caruso, J. A. Development of hydride generation methods for atomic spectroscopic analysis. *Analytical Chemistry*, v. 51, 1979, 889A-898A.
- [88] D'Ulivo, A.; Mester, Z.; Meija, J.; Sturgeon, R. E. Mechanism of generation of volatile hydrides of trace elements by aqueous tetrahydroborate (III). Mass spectrometric studies on reaction products and intermediates. *Analytical Chemistry*, v. 79, 2007, 3008-3015.
- [89] Laborda, F.; Bolea, E.; Baranguan, M. T.; Castillo, J. R. Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over?. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 57, 2002, 797–802.
- [90] Pergantis, S. A.; Winnik, W.; Heithmar, E. M.; Cullen, W. R. Investigation of arsine-generating reactions using deuterium-labeled reagents and mass spectrometry. *Talanta*, v. 44, 1997, 1941-1947.
- [91] D'Ulivo, A. Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes towards the clarification of most controversial aspects. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 65, 2010, 360–375.
- [92] D'Ulivo, A.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E. The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents. *Spectrochimica Acta Part B*,

v. 60, 2005, 423–438.

[93] Segade, S. R.; Tyson, J. F. Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 58, 2003, 797–807.

[94] Guo, X. W.; Guo, X. M. Determination of cadmium at ultratrace levels by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 10, 1995, 987-991.

[95] Guo, X. W.; Guo, X. M. Studies on the reaction between cadmium and potassium tetrahydroborate in aqueous solution and its application in atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 310, 1995, 377-385.

[96] Sanz-Medel, A.; Valdés-Hevia y Temprano, M. C.; García, N. B.; la Campa, M. R. F. Generation of cadmium atoms at room temperature using vesicles and its application to cadmium determination by cold vapor atomic spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 67, 1995, 2216-2223.

[97] Heller, A. A.; Weber, J. H. Seasonal study of speciation of mercury (II) and monomethylmercury in *Spartina alterniflora* from the Great Bay Estuary, NH. *The Science of the Total Environment*, v. 221, 1998, 181-188.

[98] Kaercher, L. E.; Goldschmidt, F.; Paniz, J. N. G.; Flores, E. M. M.; Dressler, V. L. Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, 2005, 705–710.

[99] Ramalhosa, E.; Segade, S. R.; Pereira, E.; Vale, C.; Duarte, A. Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 448, 2001, 135–143.

[100] Tao, G. Willie, S. N.; Sturgeon, R. E. Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion. *Analyst*, v. 123, 1998, 1215–1218.

[101] Oliveira, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and

future trends. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, 2003, 174-182.

[102] Mitra, S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2003, 472p.

[103] Korn, M. G. A.; Boa Morte, E. S.; Santos, D. C. M. B.; Castro, J. T.; Barbosa, J. T. P.; Teixeira, A. P.; Fernandes, A. P.; Welz, B.; Santos, W. P. C.; Santos, E. B. G. N.; Korn, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, 2008, 67-92.

[104] Lewen, N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, 2011, 653–661.

[105] Nomura, C. S.; Silva, C. S.; Oliveira, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. *Química Nova*, v. 31, 2008, 104-113.

[106] Belarra, M. A.; Resana, M.; Moens F. V. L. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 21, 2002, 828-839.

[107] 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*, v. 62, 2007, 1051–1064.

[108] Nóbrega, J. A.; Santos, M. C.; Sousa, R. A.; Cadore, S.; Barnes, R. M.; Tatro, M. Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 61, 2006, 465–495.

[109] Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Curtius, A. J. Slurry Sampling for Hg Determination in Sediments, Sewage Sludge and Coal Samples by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, 2004, 825-831.

[110] Nunes, A. M.; Acunha, T. S.; Oreste, E. Q.; Lepri, F. G.; Vieira, M. A.; Curtius, A. J.; Ribeiro, A. S. Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in Fresh and Processed Meat Treated with Tetramethylammonium Hydroxide by Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, 2011,

1850-1857.

[111] 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, 2009, 396–401.

[112] Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. *Química Nova*, v. 20, 1997, 638-643.

[113] Würfels, M.; Jackwerth, E. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. *Analytica Chimica Acta*, v. 226, 1989, 1-16.

[114] Wasilewska, M.; Goessler, W.; Zischka, M.; Maichin, B.; Knapp, G. Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 17, 2002, 1121-1125.

[115] Gouveia, S. T.; Silva, F. V.; Costa, L. M.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. *Analytica Chimica Acta*, v. 445, 2001, 269–275.

[116] Nemati, K.; Bakar, N. K. A.; Abas, M. R. B.; Sobhanzadeh, E.; Low, K. H. Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. *Journal of Hazardous Materials*, v. 182, 2010, 453–459.

[117] Nóbrega, J. A.; Trevizan, L. C.; Araújo, G. C. L.; Nogueira, A. R. A. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 57, 2002, 1855–1876.

[118] Mesko, M. F.; Moraes, D. P.; Barin, J. S.; Dressler, V. L.; Knapp, G.; Flores, E. M. M. Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique. *Microchemical Journal*, v. 82, 2006, 183–188.

[119] 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, 2010, 4–11.

[120] 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, 2004, 3525-3529.

[121] Quaresma, M. C. B.; Cassella, R. J.; La Guardia, M.; Santelli, R. E. Rapid on-line sample dissolution assisted by focused microwave radiation for silicate analysis employing flame atomic absorption spectrometry: iron determination. *Talanta*, v. 62, 2004, 807–811.

[122] Dias, A. G.; Costa, M. A.; Guimarães, P. I. C.; Guia prático de química orgânica. Rio de Janeiro: Interciência, v. 1, 2004, 127p.

[123] Tölg, G. Extreme trace analysis of the elements – I, methods and problems of sample treatment, separation and enrichment. *Talanta*, v. 19, 1972, 1489-1521.

[124] Nieuwenhuize, J.; Poley-Vos, C. H.; Van den Akker, A. H.; Van Delft, W. Comparison of microwave and conventional extraction techniques for the determination of metals in soil, sediment and sludge samples by atomic spectrometry. *Analyst*, v. 116, 1991, 347-351.

[125] Saraswati, R.; Watters Jr., R. L. Determination of arsenic and selenium in spinach and tomato leaves reference materials using flow injection and atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 41, 1994, 1781-1790.

[126] Saraswati, R.; Vetter, T. W.; Watters Jr., R. L. Comparison of reflux and microwave oven digestion for the determination of arsenic and selenium in sludge reference material using flow injection hydride generation and atomic absorption spectrometry. *Analyst*, v. 120, 1995, 95-99.

[127] Saraswati, R.; Vetter, T. W.; Watters Jr., R. L. Determination of arsenic, selenium and mercury in an estuarine sediment standard reference material using flow injection and atomic absorption spectrometry. *Mikrochimica Acta*, v. 118, 1995, 163-175.

[128] Ferreira, S. L. C.; Jesus, R. M.; Matos, G. D.; Andrade, J. B.; Bruns, R. E.;

Santos, W. N. L.; Cavalcante, D. D.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B. Multivariate optimization and validation of an analytical methods for the determination of cadmium in wines employing ET AAS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, 2009, 788-794.

[129] Silva, D. G.; Junior, M. M. S.; Silva, L. O. B.; Portugal, L. A.; Matos, G. D.; Ferreira, S. L. C. Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminum as permanent modifier. *Analytical Methods*, v. 3, 2011, 2495-2500.

[130] Nano, R. M. W.; Bruns, R. E.; Ferreira, S. L. C.; Baccan, N.; Cadore, S. Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. *Talanta*, v. 80, 2009, 559–564.

[131] Macedo, S. M.; Santos, D. C.; Jesus, R. M.; Rocha, G. O.; Ferreira, S. L. C.; Andrade, J. B. Development of an analytical approach for determination of total arsenic and arsenic (III) in airborne particulate matter by slurry sampling and HG-FAAS. *Microchemical Journal*, v. 96, 2010, 46–49.

[132] Macedo, S. M.; Jesus, R. M.; Garcia, K. S.; Hatje, V.; Queiroz, A. F. S.; Ferreira, S. L. C. Determination of total arsenic and arsenic (III) in phosphate fertilizers and phosphate rocks by HG-AAS after multivariate optimization based on Box-Behnken design. *Talanta*, v. 80, 2009, 974–979.

[133] Becker, E. M.; Dessuy, M. B.; Boschetti, W.; Vale, M. G. R.; Ferreira, S. L. C.; Welz, B. Development of an analytical method for the determination of arsenic in gasoline samples by hydride generation–graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 71-72, 2012, 102–106.

[134] Jesus, R. M.; Junior, M. M. S.; Matos, G. D.; Santos, A. M. P.; Ferreira, S. L. C. Validation of a digestion system using a digester block/cold finger system for the determination of lead in vegetable foods employing electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*, v. 94, 2011, 942-946.

[135] Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; Borges, A. R.; Silva, M. M.; Martelli, P. B. Determination of cadmium and lead in beverages after leaching from pewter cups using graphite furnace atomic absorption spectrometry.

Talanta, v. 85, 2011, 681-686.

[136] Silva-Filho, E. V.; Sella, S. M.; Spinola, E. C.; Santos, I. R.; Machado, W.; Lacerda, L. D. Mercury, zinc, manganese, and iron accumulation in leachate pond sediments from a refuse tip in Southeastern Brazil. *Microchemical Journal*, v. 82, 2006, 196–200.

[137] Ferreira, S. L. C.; Silva, L. O. B.; Santana, F. A.; Junior, M. M. S.; Matos, G. D.; Santos, W. N. L. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. *Microchemical Journal*, 2012, doi: 10.1016/j.microc.2012.08.015.

[138] Sadiq, M.; Zaidi, T. H. A study of various factors affecting digestion of fish tissue prior to mercury determination. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 16, 1983, 57-66.

[139] Adeloju, S. B.; Dhindsa, H. S.; Tandon, R. K. Evaluation of some wet decomposition methods for mercury determination in biological and environmental materials by cold vapour atomic absorption spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 285, 1994, 359-364.

[140] Williamson, C. S.; Foster, R. K.; Stanner, S. A.; Buttriss, J. L. Red meat in the diet. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, v. 30, 2005, 323-355.

[141] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. Análise do consumo alimentar pessoal do Brasil. Rio de Janeiro, 2011, 150p.

[142] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Estatística de comércio exterior. Disponível em <www.agricultura.gov.br>. Acessado em agosto de 2012.

[143] Duailibi, J. Sem jeitinho: Exigências européias para importar carne brasileira expõem a importância de se adequar à regra do jogo. *Revista Veja*, ed. 2050, 2008.

[144] Santos, L. V.; Palmeira, E. M. Exportações gaúchas de carne bovina processada para os EUA. *Revista Acadêmica de Economía*, n. 71, 2006, 1-12.

[145] Mendes, C.; Levy, F.; Marques, M.; Montalvão, R. *Fast foods* oferecem opções mais saudáveis. *Revista Eclética*, Janeiro/Junho, 2006, 34-37.

- [146] Muñoz, I.; Gómez, M. J.; Molina-Díaz, A.; Huijbregts, M. A. J.; Fernández-Alba, A. R.; García-Calvo, E. Ranking potential impacts of priority and emerging pollutants in urban wastewater through life cycle impact assessment. *Chemosphere*, v. 74, 2008, 37-44.
- [147] Żukowska, J.; Biziuk, M. Methodological evaluation of method for dietary heavy metal intake. *Journal of Food Science*, v. 0, 2008, R1-R9.
- [148] Szkoda, J.; Żmudzki, J. Determination of lead and cadmium in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry method. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v. 49, 2005, 89-92.
- [149] Akman, S.; Demirata-Ozturk, B.; Tokman, N. Atomic absorption spectroscopy. *Food Toxicants Analysis*, Capítulo 17, 2007, 637-665.
- [150] Maranhão, T. A.; Borges, D. L. G.; da Veiga, M. A. M. S.; Curtius, A. J. Cloud point extraction for the determination of cadmium and lead in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, 2005, 667– 672.
- [151] Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; Borges, A. R.; Silva, M. M.; Martelli, P. B. Determination of cadmium and lead in beverages after leaching from pewter graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 85, 2011, 681–686.
- [152] Itami, T.; Ema, M.; Amano, H.; Kawasaki, H. Simple determination of tin in biological materials by atomic absorption spectrometry with a graphite furnace. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 15, 1991, 119-122.
- [153] Pereira, L. A.; Windmöller, C. C.; Silva, J. B. B.; Neto, W. B. Solubilização alcalina de peixes e otimização multivariada para determinação de chumbo e manganês usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. *Química Nova*, v. 34, 2011, 1167-1172.
- [154] Batista, B. L.; Grotto, D.; Rodrigues, J. L.; Souza, V. C. O.; Barbosa Jr., F. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Analytica Chimica Acta*, v. 646, 2009, 23–29.
- [155] Martins, P.; Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Kemieciki, G. A. Determination of

trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, v. 470, 2002, 195-204.

[156] Ghisi, M.; Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Curtius, A. J. Avaliação de diferentes formas de introdução de amostra biológica tratada com hidróxido de tetrametilamônio em espectrometria de absorção atômica com chama. *Revista Analytica*, n. 28, 2007, 58-65.

[157] Tormen L.; Gil, R. A.; Frescura, V. L. A.; Martinez, L. D.; Curtius A. J. Determination of trace elements in biological samples treated with formic acid by inductively coupled plasma mass spectrometry using a microconcentric nebulizer. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 65, 2010, 959–966.

[158] Tormen L.; Gil, R. A.; Frescura, V. L. A.; Martinez, L. D.; Curtius A. J. The use of electrothermal vaporizer coupled to the inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of arsenic, selenium and transition metals in biological samples treated with formic acid. *Analytica Chimica Acta*, v. 717, 2012, 21– 27.

[159] Scriver, C.; Kan, M.; Willie, S.; Soo, C.; Birnboim, H. Formic acid solubilization of marine biological tissues for multi-element determination by ETAAS and ICP-AES. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 381, 2005, 1460-1466.

[160] Gava, A. J. Princípios de tecnologia de alimentos. Nobel: São Paulo, 1984, 284p.

[161] Evangelista, J. Tecnologia de alimentos. 2ª edição, Atheneu: São Paulo, 2005, 652p.

[162] Shimokomaki, M.; Olivo, R.; Terra, N. N.; Franco, B. D. G. M. Atualidade em ciência e tecnologia de carnes. Varela: São Paulo, 2006, 236p.

[163] Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB). Guia alimentar de dietas vegetarianas para adultos. São Paulo, 2012, 65p.

[164] Teixeira, R. C. M. A.; Molina, M. C. B.; Zandonade, E.; Mill, J. G. Risco cardiovascular em vegetarianos e onívoros: um estudo comparativo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 89, 2007, 237-244.

[165] Souza, G. S.; Souza, M. O.; Marques, D. V.; Gazzola, R.; Marra, R.

Previsões para o mercado de carne. Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 29, 2011, 473-492.

[166] Ferraz, J. V. Folha de São Paulo, São Paulo, 17 jun. 2010. Consumo de carne de frango no país sobe 300% em 26 anos.

[167] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The state of food and agriculture. Roma, 2009, 166p.

[168] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) - FAOSTAT on-line statistical service. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>>. Acessado em setembro de 2012.

[169] Santos, M. V.; Proença, R. P. C.; Fiates, G. M. R.; Calvo, M. C. M. Os restaurantes por peso no contexto de alimentação saudável fora de casa. Revista de Nutrição, v. 24, 2011, 641-649.

[170] Garcia, R. W. D. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. Revista de Nutrição, v. 16, 2003, 483-492.

[171] Belik, W. Perspectivas para segurança alimentar e nutricional no Brasil. Saúde e Sociedade, v. 12, 2003, 12-20.

[172] Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). Estratégia Brasileira de Exportação 2008 – 2010, 2008, 84p.

[173] Mata, D.; Freitas, R. E. Produtos agropecuários: para quem exportar?. Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 46, 2008, 257-290.

[174] Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). Rebanho bovino brasileiro. Disponível em: <www.abiec.com.br>. Acessado em setembro de 2012.

[175] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Séries estatísticas e séries históricas. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br>>. Acessado em setembro de 2012.

[176] Rocha, E. O. Rastreabilidade na pecuária de corte brasileira: como gerenciar melhor a produção. Revista Eletrônica Nutritime, v. 2, 2005, 252-258.

[177] Souza, F. P. O mercado da carne bovina no Brasil. Revista Acadêmica

Ciências Agrárias e Ambientais, v. 6, 2008, 427-434.

[178] Centro Internacional para o Comércio e o Desenvolvimento Sustentável (ICTSD). Embargo europeu à carne brasileira poderá terminar na OMC?. Pontes Quinzenal, v. 3, 2008, 4-5.

[179] Centro Internacional para o Comércio e o Desenvolvimento Sustentável (ICTSD). Levantamento do embargo europeu à carne brasileira é criterioso. Pontes Quinzenal, v. 3, 2008, 8-9.

[180] Tavares, T. M.; Carvalho, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. Química Nova, v. 15, 1992, 147-154.

[181] Cavalli, S. B. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. Revista Nutrição, v. 14, 2001, 41-46.

[182] Mertz, W. The essential trace elements. Science, v. 213, 1981, 1332-1338.

[183] Chowdhury, M. Z. A.; Siddique, Z. A.; Hossain, S. M. A.; Kazi, A. I.; Ahsan, M. A.; Ahmed, S.; Zaman, M. M. Determination of essential and toxic metals in meats, meat products and eggs by spectrophotometric method. Journal of Bangladesh Chemical Society, v. 24, 2011, 165-172.

[184] Mercado Comum do Sul (MERCOSUL). Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Resolução nº12 de 17 de julho de 2011.

[185] Demirezen, D.; Uruç, K. Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. Meat Science, v. 74, 2006, 255–260.

[186] Camargo, A. M.; Rodrigues, V. C.; Ramos, K. C. B. T.; Oliveira, É. C. D.; Medeiros, L. F. D. Composição mineral da carne de bovinos de diferentes grupos genéticos com idades distintas. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 9, 2008, 578-584.

[187] Lima, I. V.; Pedrozo, M. F. M.; Ecotoxicologia do ferro e seus compostos. Série Cadernos de Referência Ambiental, v. 4, 2001, 112p.

[188] Silva, C. S.; Nunes, A. M.; Oreste, E. Q.; Acunha, T. S.; Vieira, M. A.;

Ribeiro, A. S. Evaluation of sample preparation methods based on alkaline and acid solubilization for the determination of Na and K in meat samples by atomic spectrometric techniques. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, 2012, 1623-1629.

[189] Borges, J. T. S.; Freitas, A. S. Aplicação do sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 20, 2002, 1-18.

[190] Santhi, D.; Balakrishnan, V.; Kalaikannan, A.; Radhakrishnan, K. T. Presence of heavy metals in pork products in Chennai (India). *American Journal of Food Technology*, v. 3, 2008, 192-199.

[191] Kan, C. A. Transfer of toxic substances from feed to food. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, 2009, 423-431.

[192] Swarup, D.; Patra, R. C.; Naresh, R.; Kumar, P.; Shekhar, P. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk. *Science of the Total Environment*, v. 349, 2005, 67-71.

[193] Souza, M. V.; Vianna, M. W. S.; Zandim, B. M.; Fernandes, R. B. A.; Fontes, M. P. F. Metais pesados em amostras biológicas de bovinos. *Ciência Rural*, v. 39, 2009, 1774-1781.

[194] Wuana, R. A.; Okieimen, F. E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network Ecology*, v. 2011, 2011, 1-20.

[195] Duruibe, J. O.; Ogwuegbu, M. O. C.; Egwurugwu, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, v. 2, 2007, 112-118.

[196] Marçal, W. S.; Buture, I. O.; Carvalho, M. C.; Fortes, M. S.; Silva, R. A. Níveis de chumbo e cádmio em suplementos minerais para bovinos comercializados em Londrina. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, 2004, 359-364.

[197] Marçal, W. S.; Sousa, A. M.; Nascimento, M. R. L.; Carvalho, M. C. Valores de chumbo inorgânico em suplementos minerais para bovinos comercializados no estado de Goiás. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71,

2004, 31-34.

[198] Commission regulation (EC) N0 32/2002 of 7th May 2002 on undesirable substances in animal feed, Official Journal of the European Union, n. L140, 30 of May of 2002, 10-21.

[199] Morgulis, S. C. F. Impacto dos contaminantes (pesticidas, metais pesados) em produtos destinados à alimentação animal (rações e insumos). In: II Conferência Nacional sobre Defesa Agropecuária, 2010, 37p.

[200] Kan, C. A.; Meijer, G. A. L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, v. 133, 2007, 84-108.

[201] Andrée, S.; Jira, W.; Schwind, K. H.; Wagner, H.; Schwägele, F. Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science*, v. 86, 2010, 38-48.

[202] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acessado em setembro de 2012.

[203] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Instrução normativa n° 11, Diário Oficial da União, n° 101, 2012, 4-8.

[204] Rodrigues, A. F. S. Estanho. *Balanço Mineral Brasileiro*, 2001, 1-29.

[205] Filgueiras, C. A. L. A nova química do estanho. *Química Nova*, v. 21, 1998, 176-192.

[206] Lee, J. D. *Química Inorgânica não tão concisa*. 5ª edição, Blucher: São Paulo, 1999, 527p.

[207] World Health Organization (WHO). International Labour Organization. Concise International Chemical Assessment Document 65: Tin and Inorganic Tin Compounds. Geneva, 2005, 73p.

[208] Food Standards Agency (FSA). Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals: Expert Group on Vitamins and Minerals, 2005, 360p.

[209] Rüdel, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 56, 2003, 180–189.

[210] Perring, L.; Basic-Dvorzak, M. Determination of total tin in canned food using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 374, 2002, 235-243.

[211] Munteanu, M.; Chirila, E.; Stanciu, G.; Marin, N. Tin determination in canned food. *Ovidius University Annals of Chemistry*, v. 21, 2010, 79-82.

[212] Vaitsman, D. S.; Afonso, J. C.; Dutra, P. B. Para que serve os elementos químicos. Interciência: Rio de Janeiro, 2001, 286p.

[213] Dantas, S. T.; Gatti, J. B.; Dantas, F. B. H.; Saron, E. S.; Kiyataka, P. H. M. Estabilidade de extrato de tomate em embalagens metálicas com baixo revestimento de estanho. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, 2012, 228-236.

[214] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Legislação: Portaria nº 28, de 18 de março de 1996. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/28_96.htm>. Acessado em setembro de 2012.

[215] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Legislação: Portaria nº 20, de 22 de março de 2007. Aprova o "regulamento técnico sobre disposições para embalagens, revestimentos, utensílios, tampas e equipamentos metálicos em contato com alimentos". *Diário Oficial da União*, 2007, 12p.

[216] Ministério de Minas e Energia (MME) – Secretária de Geologia, Mineração e Transformação Mineral (SGM). Desenvolvimento de estudos para elaboração do plano duodecenal (2010-2030) de geologia, mineração e transformação mineral. Produto 41 – cadeia do estanho – relatório técnico 67 – perfil do estanho, 2009, 25p.

[217] Castro, Í. B.; Westphal, E.; Fillmann, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, v. 34, 2011, 1021-1031.

[218] Ministério da Saúde (MS). Doenças relacionadas ao trabalho – manual de procedimentos para os serviços de saúde. Série A, normas e manuais técnicos n. 114, 2001, 580p.

- [219] Ostrakhovitch, E. A.; Cherian, M. G. Tin. In: Nordberg, G. F.; Fowler, B. A.; Nordberg, M.; Friberg L.T. Handbook on the Toxicology of Metals. 3nd edition, Academic Press – Elsevier: California, 2007, 839-859.
- [220] Blunden, S.; Wallace, T. Tin in canned food: a review and understanding of occurrence and effect. Food and Chemical Toxicology, v. 41, 2003, 1651–1662.
- [221] World Health Organization (WHO). Cadmium review. Nordic Council of Ministers, 2003, 24 p.
- [222] Cardoso, L. M. N.; Chasin, A. A. M. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. Série Cadernos de Referência Ambiental, v. 6, 2001, 122p.
- [223] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Draft toxicological profile for cadmium. U. S. Department of health and human services, 2008, 512 p.
- [224] Çiftçi, H.; Ölçücü, A. Determination of iron, copper, cadmium and zinc in some cigarette brands in Turkey. International Journal of Science e Technology, v. 2, 2007, 29-32.
- [225] Ministério da Saúde (MS). Programa nacional de controle ao tabagismo. Instituto Nacional de Câncer (Inca). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/tabagismo/>>. Acessado em outubro de 2012.
- [226] Amanuma, K.; Suzuki, K. T. Effect of intratracheal instillation of cadmium chloride on phospholipids in alveolar wash fluid. Toxicology, v. 44, 1987, 321-328.
- [227] Ministério da Saúde (MS). Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no distrito federal em 2011. Secretária de vigilância em saúde, Brasília, 2011, 131 p.
- [228] Inaba, T.; Kobayashi, E.; Suwazono, Y.; Uetani, M.; Oishi, M.; Nakagawa, H.; Nogawa, K. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-Itai disease. Toxicology Letters, v. 159, 2005, 192–201.
- [229] Thornton, I.; Rautiu, R.; Brush, S. Lead: the facts. IC Consultants Ltd:

London, 2001, 184 p.

[230] Paoliello, M. M. B.; Chasin, A. A. M. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Série Cadernos de Referência Ambiental, v. 3, 2001, 144p.

[231] International Lead Association (ILA). Lead facts – Statistics. Disponível em: <<http://www.ila-lead.org/lead-facts/statistics>>. Acessado em outubro de 2012.

[232] International Lead and Zinc Study Group (ILZSG). Lead and zinc statistics. Disponível em: <<http://www.ilzsg.org/static/statistics.aspx?from=4>>. Acessado em outubro de 2012.

[233] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead. U. S. Department of health and human services, 2007, 528 p.

[234] World Health Organization (WHO). Exposure to lead: a major public health concern. Geneva, 2010, 6 p.

[235] Vaz Jr., S. Análise química instrumental e sua aplicação em controle de qualidade de biocombustíveis. Circular Técnica da Embrapa, v. 3, 2010, 1-7.

[236] Cho, H. J.; Myung, S. W. Determination of cadmium, chromium and lead in polymers by ICP-OES using a high pressure asher (HPA). Bulletin of the Korean Chemical Society, v. 32, 2011, 489-497.

[237] Boevski, I.; Daskalova, N.; Havezov, I. Determination of barium, chromium, cadmium, manganese, lead and zinc in atmospheric particulate matter by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). Spectrochimica Acta Part B, v. 55, 2000, 1643-1657.

[238] Moss, J. C.; Hardaway, C. J.; Richert, J. C.; Sneddon, J. Determination of cadmium, copper, iron, nickel, lead and zinc in crawfish [*Procambrus clarkia*] by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a study over the 2009 season in Southwest Louisiana. Microchemical Journal, v. 95, 2010, 5–10.

[239] Skrzydlewska, E.; Balcerzak, M.; Vanhaecke, F. Determination of chromium, cadmium and lead in food-packaging materials by axial inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, v. 479, 2003, 191–202.

- [240] Djedjibegovic, J.; Larssen, T.; Skrbo, A.; Marjanović, A.; Sober, M. Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosnia and Herzegovina) determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, v. 131, 2012, 469–476.
- [241] Millour, S.; Noël, L.; Kadar, A.; Chekri, R.; Vastel, C.; Guérin, T. Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: method validation. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, 2011, 111–120.
- [242] Yu, Z.; Sun, J.; Jing, M.; Cao, X.; Lee, F.; Wang, X. Determination of total tin and organotin compounds in shellfish by ICP-MS. *Food Chemistry*, v. 119, 2010, 364–367.
- [243] Boa Morte, E. S.; Barbosa, I. S.; Santos, E. C.; Nóbrega, J. A.; Korn, M. G. A. Axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry for monitoring tin concentration in canned tomato sauce samples. *Food Chemistry*, v. 131, 2012, 348–352.
- [244] Giné, M. F. Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). CENA/USP: São Paulo, 1998, 148 p.
- [245] Cottingham, K. ICP-MS: It's Elemental. *Analytical Chemistry*, v. 76, 2004, 35A-38A.
- [246] Korn, M. G. A.; Andrade, J. B.; de Jesus, D. S.; Lemos, V. A.; Bandeira, M. L. S. F.; Santos, W. N. L.; Bezerra, M. A.; Amorim, F. A. C.; Souza, A. S.; Ferreira, S. L. C. Separation and preconcentration procedures for the determination of lead using spectrometric techniques: a review. *Talanta*, v. 69, 2006, 16-24.
- [247] Azevedo, S. V.; Moreira, F. R.; Campos, R. C. Direct determination of tin in whole blood and urine by GF AAS. *Clinical Biochemistry*, v. 46, 2013, 123-127.
- [248] Tüzen, M. Determination of heavy metals in fish samples of the middle black sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, v. 80, 2003, 119–123.
- [249] Li, R.; Yan, H.; Yang, X.; Li, Z.; Guo, Y. Simultaneous determination of trace lead, tin and cadmium in biological samples by a chemical vapor

generation-four-channel atomic fluorescence spectrometry dual gas-liquid separator system. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 26, 2011, 1488-1493.

[250] Debacker, P.; Vandenbalck, L.; Patriarche, G. J.; Christians, G. D. Simultaneous determination of tin and lead by anodic stripping voltammetry in aqueous-alcoholic medium: application to the direct determination of these elements in canned foods. *Microchemical Journal*, v. 26, 1981, 192-197.

[251] Keawkim, K.; Chuanuwatanakul, S.; Chailapakul, O.; Motomizu, S. Determination of lead and cadmium in rice samples by sequential injection/anodic stripping voltammetry using a bismuth film/crown ether/naftion modified screen-printed carbon electrode. *Food Control*, v. 31, 2013, 14-21.

[252] Ribeiro, A. S.; Arruda, M. A. Z.; Cadore, S. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio: uma revisão crítica. *Química Nova*, v. 25, 2002, 396-405.

[253] L'Vov, B. V. The analytical use of atomic absorption spectra. *Spectrochimica Acta*, v. 17, 1961, 761-770.

[254] Kurfürst, U. Solid sample insertion systems and L'Vov platform effect. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, v. 322, 1985, 660-665.

[255] Correia, P. R. M.; Nomura, C. S.; Oliveira, P. V. Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas. *Revista Analytica*, n. 5, 2003, 52-59.

[256] Lajunen, L. H. J.; Perämäki, P. Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission. 2nd edition, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2004, 342 p.

[257] Kauer, F. AAS: princípios e aplicações. Shimadzu Brasil, 2008, 126 p.

[258] Zhe-Ming, N.; Bin, H.; Heng-Bin, H. Minimization of sulfate interference in selenium determination by furnace atomic absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 49, 1994, 947-953.

[259] Froes, R. E. S.; Windmüller, C. C.; Silva, J. B. B. Emprego da modificação química permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. *Revista Analytica*, n.

23, 2006, 32-43.

[260] Ebdon, L.; Lechotycki, A. The determination of lead in environmental samples by slurry atomization-graphite furnace-atomic absorption spectrophotometry using matrix modification. *Microchemical Journal*, v. 34, 1986, 340-348.

[261] Schlemmer, G.; Welz, B. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 41, 1986, 1157-1165.

[262] Reyes, M. N. M.; Campos, R. C. Graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of Ni and Pb in diesel and gasoline samples stabilized as microemulsion using conventional and permanent modifiers. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, 2005, 615–624.

[263] Ortner, H. M.; Bulska, E.; Rohr, U.; Schlemmer, G.; Weinbruch, S.; Welz, B. Modifiers and coating in graphite furnace atomic absorption spectrometry – mechanisms of action (a tutorial review). *Spectrochimica Acta Part B*, v. 57, 2002, 1835–1853.

[264] Nóbrega, J. A.; Rust, J.; Calloway, C. P.; Jones, B. T. Use of modifiers with metal atomizers in electrothermal atomic absorption spectrometry: a short review. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 59, 2004, 1337–1345.

[265] Volynsky, A. B. Comparative efficacy of platinum group metal modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 59, 2004, 1799–1821.

[266] Welz, B.; Schlemmer, G.; Mudakavi, J. R. Palladium nitrate-magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry, part 5: performance for the determination of 21 elements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 7, 1992, 1257-1271.

[267] Filho, V. R. A.; Fernandes, K. G.; Moraes, M.; Neto, J. A. G. Evaluation of the mixtures ammonium phosphate/magnesium nitrate and palladium nitrate/magnesium nitrate as modifiers for simultaneous determination of Cd, Cr, Ni and Pb in mineral water by GF AAS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, 2004, 28-33.

- [268] Meeravali, N. N.; Reddy, M. A.; Kumar, S. J. Studies on reduction of chloride matrix interferences on determination of germanium using zirconium-ruthenium and palladium-magnesium modifiers by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 62, 2007, 504–508.
- [269] Murko, S.; Milačič, R.; Veber, M.; Ščančar, J. Determination of Cd, Pb, and As in sediments of the Sava River by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 75, 2010, 113-128.
- [270] Qiao, H. Mechanism of modification by palladium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 46, 1991, 1841–1859.
- [271] Volynsky, A. B. Catalytic processes in graphite furnaces for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 51, 1996, 1573-1589.
- [272] Bader, N. R.; Zimmermann, B. Sample preparation for atomic spectroscopic analysis: an overview. *Advances in Applied Science Research*, v. 3, 2012, 1733-1737.
- [273] Ngah, C. W. Z.; Yahya, M. A. Optimisation of digestion method for determination of arsenic in shrimp paste sample using atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, v. 134, 2012, 2406–2410.
- [274] Dural, M.; Göksu, M. Z. L.; Özak, A. A. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chemistry*, v. 102, 2007, 415–421.
- [275] Sardans, J.; Montes, F.; Peñuelas, J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 65, 2010, 97–112.
- [276] Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Silva, A. F.; Borges, D. L. G.; Welz, B.; Heitmann, U.; Curtius, A. J. Determination of cobalt in biological samples by line-source and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, 2005, 693– 698.
- [277] Wu, C.; Su, S.; Lien, H.; Guo, H. The role of the chemical burns caused by

hydroxide ion in the toxicity of dermal exposure to tetramethylammonium ion in a rat model. *Burns*, v. 38, 2012, 1051–1057.

[278] Lee, C.; Wang, C.; Lin, H.; Chai, C.; Hong, M.; Ho, C. Toxicity of tetramethylammonium hydroxide: review of two fatal cases of dermal exposure and development of an animal model. *Toxicology and Industrial Health*, v. 27, 2011, 497-503.

[279] Murthy, L.; Menden, E. E.; Eller, P. M.; Petering, H. G. Atomic absorption determination of zinc, copper, cadmium and lead in tissues solubilized by aqueous tetramethylammonium hydroxide. *Analytical Biochemistry*, v. 53, 1973, 365-372.

[280] Julshamn, K.; Andersen, K. A study on the digestion of human muscle biopsies for trace metal analysis using an organic tissue solubilizer. *Analytical Biochemistry*, v. 98, 1979, 315-318.

[281] Ribeiro, A. S.; Moretto, A. L.; Arruda, M. A. Z.; Cadore, S. Analysis of powdered coffee and milk by ICP OES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchimica Acta*, v. 141, 2003, 149–155.

[282] Silva, R. G. L.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E.; Santelli, R. E.; Sella, S. M. Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry. *The Analyst*, v. 124, 1999, 1843–1846.

[283] Tseng, C. M.; Diego, A.; Martin, F. M.; Amouroux, D.; Donard O. F. X. Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 12, 1997, 743-750.

[284] Health-based Reassessment of Administrative Occupational Exposure Limits. Formic Acid (CAS No.64-48-6). 2005, 26 p.

[285] Hazardous Substances Data Base (HSDB). Toxicology Data Network (TOXNET) – United States National Library of Medicine (NLM). Formic acid. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>. Acesso em novembro de 2012.

- [286] Lepri, F. G.; Chaves, E. S.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; Oliveira, L. C. C.; Campos, R. C. Determination of trace elements in vegetable oils and biodiesel by atomic spectrometric techniques – a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 46, 2011, 175-206.
- [287] He, Y.; Hou, X.; Zheng, C.; Sturgeon, R. E. Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 388, 2007, 769-774.
- [288] Ndung'u, K.; Hibdon, S.; Flegal, A. R. Determination of lead in vinegar by ICP-MS and GFAAS: evaluation of different sample preparation procedures. *Talanta*, v. 64, 2004, 258-263.

ANEXO 1

Artigo referente ao primeiro capítulo desta dissertação, o qual foi aceito para publicação na revista científica Microchemical Journal.

ANEXO 2

Artigo referente ao segundo capítulo desta dissertação, o qual foi aceito para publicação na revista científica *Analytical Methods*.