

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



Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE
MARGARINA E CHOCOLATE PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO
DE ELEMENTOS COM POTENCIAL TÓXICO POR ICP-MS**

Carla de Andrade Hartwig

PELOTAS, RS

2015

Carla de Andrade Hartwig

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE
MARGARINA E CHOCOLATE PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO
DE ELEMENTOS COM POTENCIAL TÓXICO POR ICP-MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química (área: Química Analítica).

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

PELOTAS, RS

2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

H337d Hartwig, Carla de Andrade

Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras de margarina e chocolate para a posterior determinação de elementos com potencial tóxico por ICP-MS / Carla de Andrade Hartwig ; Márcia Foster Mesko, orientadora. — Pelotas, 2015.

145 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Margarina. 2. Chocolate. 3. Cacau. 4. Elementos tóxicos. 5. ICP-MS. I. Mesko, Márcia Foster, orient. II. Título.

CDD : 664

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado intitulada “Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras de margarina e chocolate para a posterior determinação de elementos com potencial tóxico por ICP-MS”, de autoria de Carla de Andrade Hartwig.

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko (orientadora)

.....
Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler - UFSM

.....
Prof^a. Dr^a. Emilene Mendes Becker - UFRGS

.....
Prof. Dr. Cláudio Martin Pereira de Pereira - UFPel

Dedico este trabalho aos meus pais Albino e Eva Maria, pelo carinho dedicado, e por serem os meus exemplos de trabalho, honestidade e amor. A minha irmã Liliana e meu cunhado Renato, por toda a amizade, carinho e apoio. Ao meu noivo José Carlos pelo inigualável incentivo, amor e compreensão.

**"Muitos querem aquilo que você tem,
mas vão desistir quando souberem o esforço
que você fez para conquistar."**

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

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

A minha orientadora Professora Dr^a. **Márcia Foster Mesko**, pelo exemplo profissional, pela incansável orientação e incentivo, pela amizade construída, e por sempre acreditar que seria possível.

Aos Professores Dr. **Cláudio Martin Pereira de Pereira**, Dr^a. **Emilene Mendes Becker** e Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pela participação como banca examinadora, e pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Aos Professores Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, Dr. **Neftalí Lenin Vilareal Carreño** e Dr. **Rui Carlos Zambiasi**, pela participação como banca de qualificação deste trabalho, e pelas sugestões para o seu aprimoramento.

Aos integrantes do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais da Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pelo exemplo profissional, e pela oportunidade de realização de muitos dos experimentos deste trabalho; e a **Sandra Meinen da Cruz**, por todo o apoio recebido no desenvolvimento do trabalho, e pela amizade construída.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, **Alessandra C. Teotonio**, **Carla F. Silveira**, **Diogo L. R. Novo**, **Dirce Tainá T. Oliveira**, **Filipe S. Rondan**, **Gilberto S. Coelho Jr.**, **Marcelo G. Crizel**, **Natália J. Bielemann**, **Rodrigo M. Pereira** e **Vanize C. Costa**, por todo o apoio, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Departamento de Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária, pelas liberações de horário para estudo, e as minhas colegas e amigas do Laboratório de Doenças Infecciosas, **Renata C. Schramm** e **Sílvia Regina L. Ladeira**, por todo o apoio recebido, e pela amizade.

As minhas amigas, **Daiane M. Xavier** e **Lara M. P. Montenegro**, pela amizade, apoio e incentivo.

A **Djanira O. Maciel**, secretária do PPGQ, pelo sempre dedicado auxílio.

Agradeço ainda a minha família por todo o apoio, incentivo e carinho, e a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram e apoiaram até esta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Margarina e Chocolate: produtos alimentares com elevados teores de gordura.....	23
2.1.1 Margarina: aspectos gerais.....	23
2.1.2 Processo de produção de margarinas.....	25
2.1.3 Chocolate: aspectos gerais.....	29
2.1.4 Processo de produção de chocolates.....	32
2.2 Caracterizações de margarinas e chocolates.....	33
2.3 Presença de elementos potencialmente tóxicos em margarina e chocolate: alterações na qualidade do produto e riscos à saúde humana.....	36
2.3.1 Métodos analíticos para a determinação de elementos potencialmente tóxicos em alimentos com elevado teor de gordura.....	41
2.4 Preparo de amostras.....	46
2.4.1 Preparo de suspensões ou emulsões.....	48
2.4.2 Decomposição por via úmida.....	50
2.4.3 Decomposição assistida por radiação micro-ondas.....	52
2.4.4 Decomposição assistida por radiação micro-ondas e radiação ultravioleta.....	54
2.4.5 Decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação.....	57

2.4.6	Uso de ácidos diluídos no preparo de amostras.....	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.1	Instrumentação.....	63
3.2	Reagentes.....	65
3.3	Materiais diversos.....	67
3.4	Amostras.....	67
3.5	Caracterização das amostras.....	69
3.5.1	Determinação do teor de umidade ou substâncias voláteis.....	69
3.5.2	Determinação do teor de gordura.....	69
3.5.3	Determinação do teor de cinzas.....	70
3.5.4	Determinação do teor de carbono nas amostras.....	70
3.6	Preparo de amostras por decomposição ácida com aquecimento convencional.....	71
3.6.1	Decomposição com ácido nítrico sob aquecimento convencional.....	71
3.6.2	Decomposição com ácido nítrico em presença de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio sob aquecimento convencional.....	72
3.7	Preparo de amostras por decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas.....	72
3.7.1	Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD).....	73
3.7.2	Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV).....	74
3.7.3	Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (SRC).....	75

3.8	Forma de introdução das amostras nos sistemas de decomposição ácida.....	76
3.9	Determinação da acidez dos digeridos.....	77
3.10	Determinação do teor de carbono residual nos digeridos de margarina e chocolate.....	77
3.11	Determinação de elementos potencialmente tóxicos nos digeridos de margarina e chocolate por ICP-MS.....	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1	Margarina: Avaliação de métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP-MS.....	82
4.1.1	Caracterização da amostra de margarina.....	82
4.1.2	Avaliação dos métodos de preparo de amostras utilizados para a decomposição de margarina.....	84
4.1.2.1	Decomposição ácida com aquecimento convencional.....	84
4.1.2.2	Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD).....	86
4.1.2.3	Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV).....	89
4.1.2.4	Decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (SRC).....	93
4.1.3	Branco analítico e limites de detecção obtidos com o uso dos variados métodos de decomposição das amostras de margarina.....	95
4.1.4	Avaliação da exatidão.....	98
4.1.5	Determinações elementares em margarinas por ICP-MS após decomposição por MW-UV.....	101

4.1.6	Considerações Finais.....	105
4.2	Chocolate: Avaliação da decomposição ácida assistida pelas radiações micro-ondas e ultravioleta para a posterior determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP-MS.....	107
4.2.1	Caracterização das amostras de chocolate.....	107
4.2.2	Otimização do método de decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta.....	109
4.2.3	Método comparativo: Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD).....	115
4.2.4	Avaliação da exatidão.....	115
4.2.5	Determinações elementares em chocolates por ICP-MS após decomposição por MW-UV.....	116
4.2.6	Branco analítico e limites de detecção.....	125
4.2.7	Considerações Finais.....	126
5	CONCLUSÕES.....	128
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros operacionais para a determinação de C por ICP OES.....	78
Tabela 2 -	Parâmetros operacionais para a determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP-MS.....	79
Tabela 3 -	Resultados obtidos para os ensaios de caracterização de amostra de margarina sem sal (média $\pm$ desvio padrão, n = 3)....	82
Tabela 4 -	Limites de detecção e concentrações elementares médias nos brancos analíticos obtidos utilizando as concentrações de ácido selecionadas para cada método de preparo da amostra avaliado (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	97
Tabela 5 -	Concentrações elementares determinadas por ICP-MS no CRM BCR 414, após decomposição utilizando diferentes métodos de preparo de amostra (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	100
Tabela 6 -	Concentrações elementares determinadas por ICP-MS em digeridos de 0,5 g de margarina por MW-UV utilizando HNO ₃ 4 mol l ⁻¹ como solução digestora (média $\pm$ desvio padrão, n = 3)....	102
Tabela 7 -	Resultados obtidos nos procedimentos de caracterização das amostras de chocolate (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	108
Tabela 8 -	Determinações elementares em CRM BCR 414, por ICP-MS, após decomposição por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).	116
Tabela 9 -	Resultados das determinações elementares realizadas por ICP-MS em chocolates brancos e ao leite decompostos por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	118
Tabela 10 -	Resultados das determinações elementares realizadas por ICP-MS em chocolates com diferentes concentrações de cacau decompostos por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	122

Tabela 11 -	Concentrações elementares determinadas por ICP-MS em amostras de cacau em pó decompostas por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	124
Tabela 12 -	Limites de detecção e concentrações elementares nos brancos analíticos obtidos com a utilização do método de decomposição por MW-UV com HNO_3 4 mol l^{-1} e determinação por ICP-MS (n = 3).....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma geral de produção de margarina (adaptado de MORETTO; FETT, 1998).....	26
Figura 2 -	Fluxograma geral de produção de chocolate (adaptado de AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).....	32
Figura 3 -	Frasco de quartzo e lâmpada de emissão de radiação ultravioleta utilizados no procedimento de decomposição de amostras assistido pelas radiações micro-ondas e ultravioleta (adaptado de <i>Instruction Sheet B83IB51A</i> , Anton Paar, http://www.anton-paar.com).....	55
Figura 4 -	Ilustração do interior do frasco de quartzo no sistema de decomposição de amostras assistido pelas radiações micro-ondas e ultravioleta.....	56
Figura 5 -	Sistema de decomposição de amostras em câmara única de reação (adaptado de Ultrawave – Single Reaction Chamber (SRC), Milestone, http://www.milestonesci.com).....	58
Figura 6 -	Forno de micro-ondas comercial Multiwave 3000® (Anton Paar) (a); rotor equipado com 8 frascos de quartzo (b); e lâmpada de emissão de radiação ultravioleta em quartzo, com acessórios (anel e base) em PTFE (c).....	63
Figura 7 -	Bloco digestor MA 4025 (Marconi), equipado com frascos de vidro.....	64
Figura 8 -	Sistema SRC comercial UltraWave® (Milestone) (a); e suporte equipado com 5 frascos de quartzo (b).....	64
Figura 9 -	Canaletas construídas a partir de ponteira de polipropileno, com e sem massa de amostra a ser transferida pra frasco de decomposição.....	77

Figura 10 -	Fluxograma simplificado dos métodos de preparo de amostras e respectivos parâmetros avaliados neste trabalho.....	80
Figura 11 -	Teores de carbono residual obtidos nos digeridos de 0,5 g de margarina, após decomposição por MW-AD, utilizando variadas concentrações de ácido nítrico como solução digestora (n = 3).....	86
Figura 12 -	Aspecto da solução obtida pelo tratamento de 0,5 g de margarina por MW-AD utilizando HNO_3 2 mol l ⁻¹ como solução digestora.....	87
Figura 13 -	Teores de carbono residual obtidos nos digeridos de 0,5 g de margarina, após decomposição por MW-UV, utilizando variadas concentrações de ácido nítrico como solução digestora (n = 3).....	89
Figura 14 -	Aspecto dos digeridos de 0,5 g de margarina por MW-UV, independente da concentração de HNO_3 avaliada como solução digestora.....	90
Figura 15 -	Representação do perfil gráfico da decomposição de 0,5 g de margarina utilizando o programa de irradiação com micro-ondas denominado como “programa de irradiação A”.....	92
Figura 16 -	Teores de carbono residual obtidos nos digeridos de 0,5 g de margarina, após decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema SRC, utilizando variadas concentrações de HNO_3 como solução digestora (n = 3).....	94
Figura 17 -	Recuperações para As  , Cd  , Co  , Cr  , Cu  , Mn  , Mo  , Ni  , Pb  , Pd , Pt , Rh e Sr determinadas por ICP-MS em amostras de margarina adicionadas de solução com concentração conhecida dos analitos, decompostas por métodos variados (n = 3).....	99

- Figura 18 -** Teores de carbono residual  e acidez  dos digeridos de 0,5 g de chocolate ao leite por MW-UV, utilizando concentrações variadas de HNO_3 como solução digestora ($n = 3$)..... **110**
- Figura 19 -** Recuperações para As , Cd , Co , Cr , Cu , Mn , Mo , Ni , Pb  e Sr  determinadas por ICP-MS em amostras de chocolate adicionadas de solução com concentração conhecida dos analitos, decompostas por MW-UV utilizando HNO_3 nas concentrações de 4, 7 ou $14,4 \text{ mol l}^{-1}$ como solução digestora ($n = 3$)..... **112**

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*

ABICAB – Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados

ALINORM – informes ou outros documentos de trabalho apresentados pela comissão do *Codex Alimentarius*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists (Association of Analytical Communities)*

BCR – *Community Bureau of Reference*

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CNS – Conselho Nacional da Saúde

CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CODEX – *Codex Alimentarius*

CRM – material de referência certificado, do inglês *certified reference material*

F AAS – espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FDA – *Food and Drug Administration*

GF AAS – espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

HR-CS AAS – espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, do inglês *high-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry*

IC – cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*

ICP – plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma*

ICP-MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP OES – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

IOM – *Institute of Medicine of the National Academies*

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

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS – Ministério da Saúde

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

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

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

PTFE – politetrafluoretileno

RCC – teor de carbono residual, do inglês *residual carbon content*

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

SRC – câmara de reação única, do inglês *single reaction chamber*

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

TDS – *Total Diet Study*

UV – ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

RESUMO

Título: Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras de margarina e chocolate para a posterior determinação de elementos com potencial tóxico por ICP-MS

Autor: Carla de Andrade Hartwig

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

Nesse estudo foram desenvolvidos métodos de preparo de amostras de margarina e chocolate, visando a posterior determinação de elementos com potencial tóxico por ICP-MS. Inicialmente, métodos baseados em decomposições ácidas com aquecimento convencional, assistida por radiação micro-ondas (MW-AD), assistida pelas radiações micro-ondas e ultravioleta (MW-UV), e assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (SRC) foram avaliados para a decomposição de margarina. Nesses métodos o uso de elevadas massas de amostra e de soluções ácidas diluídas foi avaliado. Assim, o método MW-UV utilizando HNO_3 4 mol l^{-1} foi selecionado para a decomposição de 0,5 g de margarina, tendo em vista o uso de solução diluída e os baixos teores de carbono residual obtidos nos digeridos. Esse método foi também otimizado para amostras de chocolate, sendo possível decompor até 0,6 g de amostra, usando HNO_3 4 mol l^{-1} . Na etapa de determinação por ICP-MS foi possível quantificar vários elementos nas amostras de margarina e chocolate, sendo que nesse último foi observada relação entre as maiores concentrações de alguns elementos e o conteúdo de cacau. A exatidão foi comprovada através da decomposição de um material de referência certificado (CRM BCR 414) sob as mesmas condições das amostras, quando não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações certificadas e os valores obtidos para todos os analitos. Além disso, foram realizados ensaios de recuperação, obtendo-se recuperações entre 93 e 105% para todos os elementos em ambas as amostras. Os desvios padrão relativos foram sempre inferiores a 7%.

Palavras-chave: margarina, chocolate, cacau, elementos tóxicos, preparo de amostras, ICP-MS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado em Química

Pelotas, novembro de 2015.

ABSTRACT

Title: Development of sample preparation methods of margarine and chocolate for subsequent determination of potential toxic elements by ICP-MS

Author: Carla de Andrade Hartwig

Supervisor: Dr^a. Márcia Foster Mesko

In this study were developed sample preparation methods for margarine and chocolate, for subsequent determination of potential toxic elements by ICP-MS. Firstly, methods based on conventional heating, microwave-assisted heating (MW-AD), microwave and UV-assisted heating (MW-UV), and microwave-assisted heating in a single reaction chamber (SRC) using acid solutions were evaluated for margarine decomposition. In these methods, the use of higher sample mass and diluted acid solution was evaluated. Thus, the MW-UV method using 4 mol l⁻¹ HNO₃ was selected for decomposition of 0.5 g of margarine, in view of the use of diluted solution and the lower residual carbon content obtained in the digests. This method was also optimized for chocolate samples, being possible to decompose up to 0.6 g of sample, using 4 mol l⁻¹ HNO₃. By ICP-MS analysis was possible to determine several elements in margarine and chocolate samples. For chocolate, a relation between the higher concentrations of some elements and the cocoa content was observed. The accuracy was evaluated by decomposition of a certified reference material (CRM BCR 414) in same conditions of the sample, and no significant differences were observed between the certified concentrations and the obtained values for all analytes. Moreover, a spike test was performed and recoveries between 93 and 105% were obtained for analytes in both samples. The relative standard deviation was always lower than 7%.

Keywords: margarine, chocolate, cocoa, toxic elements, sample preparation, ICP-MS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Doctoral Thesis in Chemistry

Pelotas, November 2015.

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os óleos vegetais e as gorduras comestíveis, como a margarina, desempenham papel importante na alimentação humana, de forma que, atualmente, se tem dado especial atenção não somente à composição orgânica destes, mas também à espécies inorgânicas, que possam estar presentes nestes alimentos desde a matéria bruta, ou serem introduzidas durante os processos industriais. A presença de metais pesados ou de transição deve ser monitorada neste tipo de alimento, pois dependendo da concentração em que estejam presentes podem colocar em risco a saúde humana, ou mesmo interferir na qualidade (sabor e estabilidade) dos óleos e gorduras (BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997; SOUZA *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2011).

Especialmente no caso das margarinas, a presença de metais como níquel, cobre, platina e paládio, pode ser explicada pelo uso destes como espécies ativas em catalisadores para processos de hidrogenação (GABROVSKA *et al.*, 2006). A hidrogenação de óleos vegetais consiste basicamente em um processo de mudança da consistência de óleo líquido para um produto semi-sólido, seguida de redução de compostos que possam contribuir para a rancidez oxidativa do mesmo (BALAKOS; HERNANDEZ, 1997; GABROVSKA *et al.*, 2006). Dentre os metais empregados com a finalidade de catalisar o processo de hidrogenação, o níquel é o mais utilizado devido às suas características de disponibilidade, baixo custo e natureza inerte em relação ao óleo (FERNANDEZ *et al.*, 2005; GABROVSKA *et al.*, 2006).

A presença de metais e outros elementos potencialmente tóxicos também tem sido relatada em chocolates, geralmente como resultado do processo produtivo, embalagens utilizadas para estocagem, ou sendo provenientes das matérias-primas utilizadas na fabricação deste produto alimentar. Assim, considerando-se que os chocolates são amplamente consumidos no mundo, por pessoas de todas as idades e classes sociais, e que contêm considerável teor de gordura (incluindo gordura vegetal), estes produtos alimentares também se constituem como amostras de interesse no campo da investigação quanto à presença de elementos potencialmente tóxicos (DAHIYA *et al.*, 2005; WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013).

Neste sentido, dada a importância da determinação de elementos com potencial tóxico em alimentos com elevado teor de gordura e de amplo consumo,

como margarinas e chocolates, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e exatos, tendo em vista que geralmente se tratam de determinações em nível de traço, que possam servir de alternativa aos métodos utilizados atualmente.

De acordo com dados da literatura, dentre as técnicas analíticas disponíveis para a determinação de elementos potencialmente tóxicos em margarina, as técnicas espectrométricas têm sido amplamente utilizadas, fornecendo resultados satisfatórios, com características multielementares. Por sua vez, no que se refere ao preparo das amostras previamente à determinação, alguns dos métodos utilizados apresentam inconvenientes relacionados principalmente à utilização de procedimentos demorados ou sujeitos à contaminação. Procedimentos de preparo de amostras alternativos, baseados na formação de emulsões, têm sido propostos atualmente para amostras de gorduras vegetais, visando a simplificação do procedimento, e aumentando a frequência de análise. Porém, este tipo de preparo de amostras requer cuidados no que se refere à manutenção da homogeneidade e estabilidade da emulsão (BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997; SOUZA *et al.*, 2005).

As técnicas espectrométricas também são amplamente utilizadas nas determinações elementares em chocolates, sendo geralmente precedidas de procedimentos de decomposição das amostras envolvendo reagentes oxidantes concentrados (JALBANI *et al.*, 2009; REHMAN; HUSNAIN, 2012; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; YANUS *et al.*, 2014). Entretanto, quando as determinações são realizadas por técnicas suscetíveis a interferências pelo uso de ácidos concentrados, há a necessidade da realização de etapas adicionais de diluição dos digeridos previamente a determinação, o que pode inviabilizar a quantificação de elementos presentes em baixas concentrações (STEWART; OLESIK, 1998). Assim, muitos autores têm optado pelo uso de técnicas espectrométricas sensíveis, que não sofram interferências por ácidos, como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), para as determinações elementares em chocolate. No entanto, esta técnica geralmente não permite determinações elementares simultâneas, elevando assim o tempo necessário para que sejam realizadas análises multielementares nas amostras (GÜLDAS, 2008; IEGGLI *et al.*, 2011 (a); REHMAN; HUSNAIN, 2012; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014).

Neste sentido, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) merece destaque dentre as técnicas analíticas disponíveis para a determinação de elementos potencialmente tóxicos presentes em baixas concentrações em margarinas e chocolates, tendo em vista que permite determinações simultâneas dos analitos, com rapidez e sensibilidade adequadas. Porém, considerando-se que esta técnica é suscetível a interferências pela presença de carbono, o seu uso requer uma etapa prévia de preparo de amostras, que seja capaz de converter as amostras em uma solução com baixo teor de carbono dissolvido (BECKER, 2007; GRINDLAY *et al.*, 2013). Além disso, considerando-se que as análises por ICP-MS também podem sofrer interferências pela presença de ácidos, a utilização de reagentes diluídos na etapa de preparo de amostras é desejável (STEWART; OLESIK, 1998; BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a decomposição de margarina e chocolate, visando a posterior determinação de elementos com potencial tóxico por ICP-MS. Para tanto, foi investigada a possibilidade de decomposição dessas amostras, as quais contêm consideráveis teores de gordura, ou seja, são de difícil decomposição, utilizando reagentes menos concentrados quanto possível. Foram avaliadas margarinas com e sem sal, bem como variados tipos de chocolate, visando a verificação da variação das concentrações elementares nestas amostras. Nas amostras de chocolate, foi também investigada a relação entre as concentrações elementares observadas e o teor de cacau do produto, o que motivou a análise de cacau em pó quanto a presença de elementos com potencial tóxico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica está dividida em três partes principais. Na primeira delas, serão abordados alguns aspectos gerais sobre margarinas e chocolates, relacionados principalmente ao seu processo de obtenção e sua caracterização. Na segunda parte será discutida a presença de elementos potencialmente tóxicos em margarinas e chocolates, destacando sua relação com a qualidade dos produtos e com possíveis riscos à saúde humana, bem como os métodos analíticos usualmente aplicados para a determinação elementar nestas amostras. Nessa parte também serão abordadas as potencialidades e limitações da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), bem como sua aplicação nas determinações elementares em margarinas e chocolates. Em uma terceira e última parte, serão descritos os métodos de preparo de amostras geralmente utilizados para este tipo de amostras previamente as determinações elementares, bem como os métodos de preparo de amostra com potencial aplicação neste campo de análise, avaliados no decorrer deste trabalho.

2.1 Margarina e chocolate: produtos alimentares com elevados teores de gordura

2.1.1 Margarina: aspectos gerais

Segundo a Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por margarina o produto gorduroso em emulsão estável com leite ou seus constituintes ou derivados, e outros ingredientes, contendo cheiro e sabor característicos, e destinado à alimentação humana. A gordura láctea, quando presente, não deve exceder 3% (m m^{-1}) do teor de lipídeos totais, o qual não deve ser superior a 95% (m m^{-1}) (MAPA - PORTARIA 372, 1997).

Como descreve Rodrigues *et al.* (2004), apesar de o conceito de emulsão ser uma dispersão de um líquido em outro, ambos imiscíveis, quando se trata de alimentos tem-se um significado mais amplo, visto que sólidos ou gases podem estar presentes. Assim, na composição da margarina, estão presentes também aromatizantes, corantes, conservantes e substâncias nutricionais, como vitaminas (MORETTO; FETT, 1998), sendo que a adição de vitamina A pode ser exigida por legislação específica, com a finalidade de atender necessidades nutricionais de uma população alvo (MAPA - PORTARIA 372, 1997). O cloreto de sódio pode ser adicionado como contribuinte de sabor, ou como conservante, sendo utilizadas quantidades entre 0,1 e 0,3% (m m^{-1}) (MORETTO; FETT, 1998). Demais aditivos, quando presentes em margarinas, devem atender as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), expressas pela Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988, do Conselho Nacional da Saúde do Ministério da Saúde, (ANVISA – RDC 04 CNS/MS, 1988) e Resolução nº 23, de 15 de fevereiro de 2005 (ANVISA – RDC 23, 2005).

Considerando-se que os maiores componentes da margarina são óleos e gorduras que sofreram processo de refino, é importante destacar que a proporção destes componentes varia de acordo com a finalidade do produto. Assim, os principais tipos de margarinas e produtos assemelhados são as margarinas duras, que são mais adequadas para procedimentos de fritura, cozimento e panificação;

margarinas cremosas, que surgiram no Brasil no princípio dos anos 70 e apresentam alto poder de espalhabilidade, mesmo à temperatura de refrigeração; margarinas “aeradas”, que são incorporadas de 10 a 40% de nitrogênio, ocasionando um aumento de volume e consequente diminuição da densidade e da quantidade de calorias por porção; margarinas líquidas, compostas de misturas de óleos líquidos ou levemente hidrogenados, com pequena quantidade (cerca de 5%) de gordura dura, o que garante a fluidez do produto em todas as temperaturas; e margarinas para uso industrial (confeitaria e cozinha profissional), preparadas por misturas contendo de 4 – 8% de gorduras duras. As margarinas industriais contêm, normalmente, cerca de 90% de gordura emulsificada em água ao invés de leite (MORETTO; FETT, 1998; PAVAN, 2008; SOARES, 2014).

Além destes tipos de margarina, foi lançado no Brasil em 1983 o creme vegetal, um produto semelhante à margarina, porém com menor teor de gordura (60 – 65%) (MORETTO; FETT, 1998). A Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA, define creme vegetal como sendo todo produto em forma de emulsão plástica ou fluida, constituído principalmente de água e óleo e/ou gordura vegetal, podendo ser adicionado(s) outro(s) ingrediente(s) (ANVISA - RDC 270, 2005).

É comum a confusão de margarina com creme vegetal, porém apesar de apresentarem a mesma origem, sendo frequentemente comercializados juntos, tratam-se de produtos diferentes. Margarina e creme vegetal diferem no teor de gordura e na quantidade calórica, sendo que o creme vegetal possui menor quantidade de gorduras totais e, por isso, é menos calórico que a margarina (MORETTO; FETT, 1998). Além disso, cremes vegetais apresentam maiores quantidades de cinzas e de umidade se comparado a margarinas (MORETTO; FETT, 1998; SHIMIZU, 2009).

Posteriormente, na década de 90, surgiram as halvarinas, com teores ainda menores de gordura (40 – 45%, m m^{-1}), e percentual de umidade superior a 50% (m m^{-1}). Estes produtos, assim como os cremes vegetais, não podem receber a denominação de margarina devido ao seu baixo conteúdo gorduroso, de acordo com o código alimentar 256, expresso pela *CODEX Alimentarius International Food Standards*, da *Food and Agriculture Organization and World Health Organization*, em 2007 (FAO/WHO - CODEX STAN 256, 2007). Ainda, devido ao elevado teor de umidade, estes produtos não são utilizados em frituras ou cozimento. As vantagens

desses produtos em relação à margarina residem em poderem ser mais econômicos, e no menor valor calórico (MORETTO; FETT, 1998).

A margarina foi desenvolvida em 1869 pelo químico francês *Hippolyte Mege Mouries* para substituir a manteiga. Na época, a França atravessava uma grande crise econômica e a manteiga tornou-se um produto caro para o consumo das classes pobres e do exército, de forma que foi necessário o desenvolvimento de um produto parecido com a manteiga, que fosse mais acessível e duradouro. O termo margarina provém da palavra grega “margaron” que significa “pérola” devido ao seu aspecto perolado. A partir daí, esse produto passou por várias transformações, e novas tecnologias foram descobertas, aumentando assim a produção e consequentemente o consumo de margarinas (RODRIGUES *et al.*, 2004; SHIMIZU, 2009).

No trabalho de Chiara, Sichieri e Carvalho (2003), os autores apontam para um incremento no consumo de margarina no Brasil nas últimas décadas, através da substituição da manteiga e do crescente aumento na manufatura e na ingestão de produtos alimentícios industrializados. Esta mudança nos hábitos alimentares da população, com consequente aumento do consumo de alimentos industrializados, se deve principalmente a facilidade e a variedade de produtos disponíveis no mercado, atendendo a diferentes gostos e classes sociais.

2.1.2 Processo de produção de margarinas

O processo de obtenção de margarinas tem evoluído muito nos últimos anos. Entretanto, de forma geral, este processo baseia-se na formação de uma emulsão, sendo constituído das seguintes etapas, representadas na Figura 1 (MORETTO; FETT, 1998; PAVAN, 2008; SOARES, 2014):

- Preparação da fase lipídica;
- Preparação da fase aquosa;
- Preparação da emulsão, resfriamento e cristalização;
- Embalagem e armazenamento.

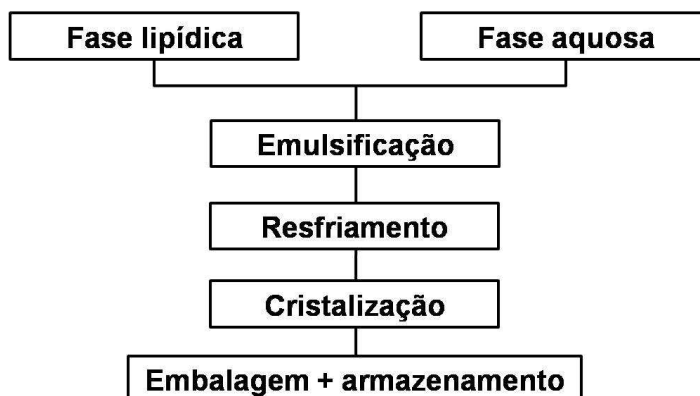


Figura 1 - Fluxograma geral de produção de margarina (adaptado de MORETTO; FETT, 1998).

Nesse processo, a fase lipídica é formada pela mistura de óleos e gorduras vegetais modificadas (provenientes de processos de hidrogenação, interesterificação ou fracionamento), adicionadas de corantes, aromatizantes e outros ingredientes solúveis. Por sua vez, a fase aquosa é composta de água, sal (quando presente), leite (geralmente adicionado na forma de pó), conservantes e emulsionantes (MORETTO; FETT, 1998; SOARES, 2014).

Os processos de emulsificação e cristalização têm a finalidade de formar um produto gorduroso estável, no qual a fase aquosa se distribui. A emulsificação ocorre a partir da mistura das fases lipídica e aquosa, proporcionalmente dosadas em uma bomba de aço inoxidável, na temperatura de 30 – 34 °C, sob agitação e elevada velocidade. A emulsão é então levada ao resfriamento em um congelador cilíndrico (-15 à -18 °C), onde solidifica, sendo removida por meio de lâminas raspadoras. Posteriormente, na etapa de cristalização, há a formação de uma rede sólida de cristais retendo os glóbulos de água e óleo, e estabilizando a emulsão. Essa etapa pode ocorrer em sistema estático ou sob agitação. Ao final do processo, o produto é encaminhado para o envase e armazenagem (MORETTO; FETT, 1998; SOARES, 2014).

As gorduras hidrogenadas são a escolha mais comum para a formação da fase lipídica nos processos de obtenção de margarina e similares. Também outros produtos comerciais, como por exemplo, combustíveis, fármacos, polímeros, entre

outros, envolvem em pelo menos uma das etapas do processo, a reação de hidrogenação (PAVAN, 2008; PINHO; SUAREZ, 2013).

Por hidrogenação entende-se o processo químico de eliminação de grupos funcionais insaturados pela adição de átomos de hidrogênio (PINHO; SUAREZ, 2013), sendo que na indústria alimentícia, este processo é amplamente utilizado na elaboração de margarinas, gorduras, produtos de panificação etc. (STANKOVIC *et al.*, 2009). A hidrogenação de óleos vegetais é de especial interesse no processamento de gorduras e óleos comestíveis, por permitir a mudança da estrutura, e consistência de óleos vegetais, com o intuito de produzir alimentos com baixo número de insaturações e elevados pontos de fusão, aumentando assim sua estabilidade oxidativa (GABROVSKA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Assim, a hidrogenação é muito utilizada pela indústria alimentícia para aumentar o prazo de validade de óleos ou para produzir as gorduras vegetais hidrogenadas. A diferença entre os dois processos é o grau de hidrogenação. Para estabilizar óleos, a hidrogenação é feita de forma parcial, mantendo um determinado grau de insaturação no produto final, de forma que sua fluidez não seja comprometida e ele continue líquido a temperatura ambiente. Para a produção de gorduras vegetais hidrogenadas, a hidrogenação é realizada de forma quase completa, o que proporciona a mudança do estado físico da gordura, passando para sólido (PINHO; SUAREZ, 2013).

Basicamente, a hidrogenação consiste na adição de hidrogênios a cada átomo de carbono das ligações duplas, convertendo-as em ligações simples (SOLOMONS; FRAYHLE, 2001), em um processo em que a obtenção das características químicas, físicas, sensoriais e de textura desejáveis no produto, pode ser controlada pelas condições de reação: (i) temperatura, (ii) concentração e tipo de catalisador, (iii) pressão, e (iv) agitação. Desta forma, esse tipo de reação não ocorre à temperatura ambiente e sem a presença de um catalisador (SOLOMONS; FRAYHLE, 2001).

O processo de hidrogenação consiste em colocar em contato sob certa temperatura e pressão, o óleo e o hidrogênio em presença de um catalisador metálico finamente dividido, sendo que os mais utilizados são platina, níquel, paládio, ródio e rutênio (MORETTO; FETT, 1998; SOLOMONS; FRAYHLE, 2001). O catalisador metálico atua adsorvendo os reagentes sob sua superfície, rompendo

parcialmente as ligações C-C e H-H, enquanto ligações secundárias se estabelecem com o catalisador. Forma-se então, transitoriamente, um complexo organometálico de curta vida que não pode ser isolado. Efetiva-se em seguida a adição e o produto é desorvido, deixando a superfície do catalisador livre para adsorver novas moléculas dos reagentes (MORETTO; FETT, 1998). Dentre os catalisadores metálicos disponíveis, níquel tem sido a principal escolha da indústria para os processos de hidrogenação, em grande parte devido à disponibilidade, baixo custo e natureza inerte deste metal em relação ao óleo (MORETTO; FETT, 1998; GABROVSKA *et al.*, 2006).

Assim, dadas as condições necessárias para a realização da reação de hidrogenação, o processo se desenvolve no interior de reatores hermeticamente fechados, sob agitação vigorosa, em temperaturas superiores a 180 °C e com pressões entre 0,5 e 4 atmosferas. Após o término da reação, o produto é filtrado para a retirada do catalisador e branqueado com o intuito de reduzir o teor de fosfolípidios, evitando assim o escurecimento do produto devido às altas temperaturas utilizadas (SOLOMONS; FRAYHLE, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas o uso da hidrogenação para a produção de gorduras vegetais na indústria de alimentos tem sido cada vez mais questionado. Isto se justifica, considerando que durante o processo pode ocorrer a reação paralela de isomerização de ligações duplas, ou seja, parte dos isômeros *cis* é convertida em isômeros *trans*, indesejáveis por ocasionarem riscos à saúde humana. Esta reação acontece porque termodinamicamente os isômeros *trans* são mais estáveis (STANKOVIC *et al.*, 2009; SHIMIZU, 2009; PINHO; SUAREZ, 2013). Além disso, outro inconveniente das reações de hidrogenação na obtenção de margarinas é a possibilidade da contaminação do produto final por resíduos de catalisadores metálicos que não tenham sido completamente removidos no tratamento final, os quais podem promover riscos ao consumidor, bem como a redução da qualidade do produto (SAVCHENKO; MAKARYAN, 1999; ANWAR *et al.*, 2004).

Assim, considerando as desvantagens associadas aos processos de hidrogenação, principalmente no que se refere ao teor de gorduras *trans*, tem-se procurado atualmente a substituição do processo de hidrogenação por tecnologias alternativas. Nesse sentido, as modificações tecnológicas possíveis são representadas basicamente por alterações no processo de hidrogenação, uso de

interesterificação, uso de fracionamento, ou uso de óleos de sementes geneticamente modificadas (SAVCHENKO; MAKARYAN, 1999; HUNTER, 2006; PINHO; SUAREZ, 2013).

Modificações nas condições de hidrogenação (pressão, temperatura e catalisador) podem levar a obtenção de gorduras com baixos teores de isômeros *trans*, aumentando o grau de hidrogenação e elevando a quantidade de gorduras saturadas. Por sua vez, os processos de interesterificação representam a redistribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis, sem alterações na composição química e sem a formação de isômeros *trans*. Entretanto, a interesterificação é capaz de promover satisfatórias modificações nas propriedades químicas de óleos e gorduras (MORETTO; FETT, 1998; HUNTER, 2006).

O fracionamento consiste em uma forma de promover alterações nas propriedades químicas de óleos e gorduras, bem como aumentar a sua estabilidade, através da separação física entre frações sólidas e líquidas por cristalização parcial, ou simplesmente filtração ou prensagem sob diferentes temperaturas. Também a utilização de sementes oleaginosas com composição de ácidos graxos modificada por processos de reprodução de sementes ou engenharia genética podem ser utilizados, visando a obtenção de óleos com ácidos graxos saturados (MORETTO; FETT, 1998; PAVAN, 2008).

2.1.3 Chocolate: aspectos gerais

Segundo a Resolução nº 264, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA, entende-se por chocolate o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao L.*), massa (ou pasta, ou liquor) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% (m m⁻¹) de sólidos totais de cacau. Ainda, esta mesma resolução define chocolate branco como sendo o produto obtido a partir da mistura de manteiga de cacau com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 20% (m m⁻¹) de sólidos totais de manteiga de cacau. Ambos os produtos podem apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (ANVISA - RDC 264, 2005).

Do ponto de vista químico, os chocolates podem ser vistos como suspensões de finas partículas sólidas (açúcar, cacau e leite em pó, dependendo do tipo do chocolate) em uma fase gordurosa, que representa 30% (m m^{-1}) do produto total (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007; TORRES-MORENO *et al.*, 2015). O teor lipídico dos chocolates é proveniente principalmente da manteiga de cacau, porém, podem estar também presentes gorduras do leite e gorduras vegetais provenientes de processos de hidrogenação (GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; REHMAN; HUSNAIN, 2012). Os carboidratos, por sua vez, representados principalmente por açúcar, constituem cerca de 45% (m m^{-1}) da massa total dos chocolates (TORRES-MORENO *et al.*, 2015). A presença de aditivos em chocolates deve atender as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), expressas pela Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988, do Conselho Nacional da Saúde do Ministério da Saúde (ANVISA – RDC 04 CNS/MS, 1988) e Resolução nº 387, de 05 de agosto de 1999 (ANVISA – RDC 387, 1999).

Os chocolates são consumidos mundialmente, por pessoas de todas as idades e classes sociais (DAHIYA *et al.*, 2005; IEGGLI *et al.*, 2011 (b); VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014), principalmente na forma de barras, ou como ingredientes de outros produtos alimentares como bolos, bolachas, ou doces (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007; TORRES-MORENO *et al.*, 2015). Os tipos mais comuns de chocolate são o chocolate ao leite, chocolate branco e chocolates à base de cacau, também conhecidos como chocolates “amargos”. Estes chocolates diferem quanto aos conteúdos de cacau, gordura de leite ou manteiga de cacau (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

O amplo consumo de chocolate não é atribuído somente ao sabor e boa digestibilidade do produto, mas também pelos benefícios que pode trazer à saúde (JALBANI *et al.*, 2009; IEGGLI *et al.*, 2011 (b); WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). Apesar dos elevados teores de gordura e açúcar apresentados pelos chocolates, estes produtos são fontes de energia, proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007; JALBANI *et al.*, 2009; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014). Além disso, os chocolates são reconhecidos pelos teores de flavonóides e polifenóis, originários do cacau, os quais podem reduzir os riscos de doenças de coração, e contribuir para uma vida mais saudável. A partir disso, o conteúdo de cacau em chocolates tem sido

considerado uma medida da qualidade deste produto, de forma que os chocolates a base de cacau são considerados como o tipo de chocolate de maior qualidade e mais saudável quando comparado aos chocolates dos tipos branco e ao leite (WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013; YANUS *et al.*, 2014).

É importante também mencionar que os grãos de cacau contêm vários minerais, os quais podem permanecer em seus produtos derivados, de forma que chocolates contendo cacau podem também ser fontes de elementos tanto essenciais quanto tóxicos ao organismo (JALBANI *et al.*, 2009; IEGGLI *et al.*, 2011 (b); REHMAN; HUSNAIN, 2012; WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013; BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; YANUS *et al.*, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015).

O plantio e cultivo do cacau foram iniciados no México, bem como a utilização da semente como moeda para pagar impostos e comprar escravos, em rituais de louvor aos deuses, ou como ingrediente de bebidas picantes. O cacau ganhou o mundo a partir de 1520, quando remessas foram levadas da América para a Europa, a partir da conquista do México pelos espanhóis, os quais foram os responsáveis pela abertura das primeiras indústrias chocolateiras do mundo, no final do século XVI (BECKETT, 1994; ABICAB, 2015).

A chegada do cacau ao Brasil ocorreu em 1746, pelo estado do Pará, trazido pelo francês Louis Frederic Warneaux, sendo que os primeiros cultivos da semente foram registrados no sul da Bahia, o que contribuiu para o desenvolvimento econômico da região. O clima tropical e a mão de obra abundante e barata elevaram, na metade do século XIX, o Brasil ao posto de maior exportador de cacau do mundo, exportando mais de 70 mil toneladas em 1880. Assim, no final do século XIX e início do século XX surgem as primeiras indústrias de chocolate no país, fundadas por imigrantes da Alemanha, Letônia e Suíça, sendo a primeira fábrica instalada em Porto Alegre em 1891 (BECKETT, 1994; ABICAB, 2015).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB), a produção de chocolate no Brasil tem crescido nos últimos anos. Em 2014 a produção de chocolate no país atingiu a marca de 731 mil toneladas, o que representa um crescimento de cerca de 20% em relação à produção registrada no ano de 2009. Por sua vez, os dados relativos à exportação do produto apresentaram uma redução de 15% nestes mesmos 5 anos,

enquanto que a importação brasileira de chocolate no mesmo período apresentou crescimento da ordem de 130%. Estes dados refletem um aumento no consumo de chocolate no país (ABICAB, 2015).

2.1.4 Processo de produção de chocolates

O processo de obtenção de chocolate, de forma geral, envolve algumas etapas principais. Estas etapas encontram-se apresentadas na Figura 2 (BECKETT, 1994; AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

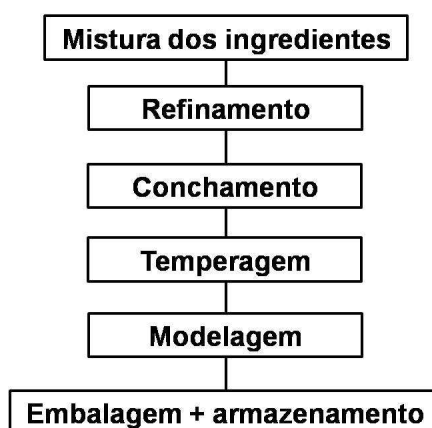


Figura 2 - Fluxograma geral de produção de chocolate (adaptado de AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

Na primeira etapa do processo de fabricação de chocolate os ingredientes em pós, líquidos e semilíquidos são misturados por tempo suficiente para se transformarem em uma massa, sob uma temperatura em torno de 40 °C, a fim de garantir que a manteiga de cacau permaneça fundida. Em seguida, a massa é submetida ao processo de refino, onde o tamanho das partículas dos ingredientes é reduzido com o intuito de torná-las imperceptíveis durante a degustação do produto final. Este processo é realizado de acordo com o tipo de chocolate que se deseja produzir, sendo que, de forma geral, o tamanho das partículas não deve ultrapassar 40 micrômetros (BECKETT, 1994; AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

A etapa seguinte, denominada conchamento, tem por finalidade eliminar os sabores indesejáveis provenientes de certos componentes naturais, e desenvolver

ou intensificar os sabores desejáveis e característicos do chocolate. Esta etapa é realizada em recipientes aquecidos, em formato de conchas, os quais contêm pás agitadoras que trabalham em temperaturas diferentes de acordo com o tipo de chocolate desejado. Neste processo o conteúdo de água do chocolate é reduzido, e são eliminadas substâncias, como ácido acético e aldeídos de baixo ponto de ebulição formados durante o processamento do cacau, os quais concedem sabores indesejáveis ao produto. Ainda nesta etapa, é feita uma nova adição de manteiga de cacau, com o intuito de promover o recobrimento das partículas do produto, desenvolvendo os sabores desejáveis e característicos do chocolate (BECKETT, 1994; AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

O processo de temperagem a que o produto é submetido posteriormente, consiste em uma cristalização parcial da manteiga de cacau, passando o chocolate do estado líquido para o estado sólido. Este processo é realizado em máquinas que promovem a troca de temperatura (de 48 °C para 28 °C) de maneira controlada, favorecendo a cristalização da manteiga de cacau e garantindo a textura e aparência perfeitas do chocolate. No caso de chocolates crocantes ou com frutas, por exemplo, os respectivos ingredientes são também adicionados nesta etapa, que antecede o processo de modelagem (BECKETT, 1994; AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

A etapa de modelagem consiste na transferência do produto para moldes que darão forma aos diferentes tipos de chocolate, sendo posteriormente embalados. As embalagens utilizadas devem apresentar barreiras contra vapores de água, passagem de luz e de componentes de aroma do próprio chocolate ou de odores provenientes do ambiente de estocagem, e serem resistentes ao transporte e distribuição. O chocolate deve ser armazenado em locais secos e bem arejados, sob baixa temperatura e sem exposição ao sol ou luminosidade (BECKETT, 1994; AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

2.2 Caracterizações de margarinas e chocolates

Dentre as caracterizações em alimentos, a determinação do teor de umidade tem destaque, devido ao fato de representar um fator de qualidade na preservação de alguns produtos, podendo inclusive afetar a estabilidade destes. O teor de

umidade corresponde a perda em peso ocorrida no produto quando aquecido em condições nas quais a água total é removida, bem como pela perda de outras substâncias que se volatilizam. O processo mais usual para a determinação do teor de umidade consiste na secagem da amostra em estufa na temperatura aproximada de 105 °C, o qual apresenta como principais vantagens a facilidade de operação, o baixo custo de análise, e a obtenção de resultados reproduzíveis. Entretanto, no caso de amostras que se decompõem ou sofrem alterações físicas na temperatura de secagem, ou ainda amostras contendo quantidades elevadas de gordura ou substâncias voláteis ou oxidáveis, outras estratégias podem ser empregadas para a determinação do teor de umidade, tais como o emprego de estufas a vácuo ou processos de destilação com líquidos imiscíveis (ZAMBIAZI, 2010).

Para amostras de margarina ou manteiga, o teor de umidade relatado na literatura está compreendido em uma faixa de 15 a 20% (m m^{-1}) (CECCHI, 2003; ZAMBIAZI, 2010). Entretanto, segundo o descrito pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), o teor de umidade em margarinas pode ultrapassar essa porcentagem, dependendo de sua constituição lipídica e da presença ou ausência de sal (TACO, 2011). Assim, segundo a TACO, margarinas que contêm óleo hidrogenado em sua composição apresentam teores de umidade da ordem de 32,2 ou 19,6% (m m^{-1}), de acordo com a presença ou ausência de sal, respectivamente. Por sua vez, para margarinas produzidas utilizando óleo interesterificado, são relatados teores de umidade para produtos com e sem sal da ordem de 32,0 e 33,4% (m m^{-1}), respectivamente (TACO, 2011).

No que se refere ao teor de umidade em chocolate, a Resolução nº 12, de 24 de julho de 1978, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) da ANVISA, recomenda como conteúdo máximo de água no produto 3,0% (m m^{-1}) (ANVISA - RDC 12 CNNPA, 1978). Por sua vez, na TACO são expressos teores de umidade da ordem de 1,3% (m m^{-1}) para chocolates ao leite, e 1,0% (m m^{-1}) para chocolates do tipo amargo (TACO, 2011).

Outro parâmetro que integra o grupo das caracterizações gerais em alimentos é a determinação do teor de cinzas, o qual corresponde ao conteúdo total de minerais na amostra alimentícia, remanescente da queima da matéria orgânica em mufla a temperaturas entre 500 e 600 °C. Entretanto, cabe ressaltar que, nestas temperaturas, pode ocorrer a volatilização parcial de alguns elementos, de forma

que o resíduo obtido pode não representar a totalidade do material inorgânico presente na amostra (ZAMBIAZI, 2010).

Assim como o teor de umidade, o conteúdo de cinzas relatado para amostras de margarina pela TACO, varia de acordo com a constituição lipídica e presença ou ausência de sal. Assim, segundo esta tabela de composição de alimentos, margarinas que contêm óleo hidrogenado em sua composição apresentam teores de cinzas da ordem de 1,9 ou 0,2% (m m^{-1}), de acordo com a presença ou ausência de sal, respectivamente; enquanto que margarinas produzidas utilizando óleo interesterificado, contêm teores de cinzas de 1,2 e 0,1% (m m^{-1}), respectivamente, para produtos com e sem sal (TACO, 2011). Para chocolates, os teores de cinzas relatados pela TACO são da ordem de 1,7 e 1,8% (m m^{-1}), para produtos dos tipos ao leite e amargo, respectivamente (TACO, 2011).

O teor de gordura, expresso em lipídeos totais, é passível de ser determinado por métodos variados, também pode ser considerado um parâmetro de caracterização de amostras alimentícias. Para amostras de manteiga e margarina, os valores relatados na literatura para gordura total são de aproximadamente 80% (m m^{-1}) (CECCHI, 2003; ZAMBIAZI, 2010), embora segundo a Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997 do MAPA, este teor possa ser de até 95% (MAPA – PORTARIA 372, 1997). Ainda, de acordo com a TACO, o teor lipídico em margarinas que contêm óleos hidrogenados em sua composição é da ordem de 81,7% (m m^{-1}) para produtos sem sal, e de 67,4% (m m^{-1}) para produtos com sal. Entretanto, quando a margarina é constituída de óleos interesterificados, os teores de lipídeos praticamente não diferem de acordo com a presença ou ausência de sal, sendo definidos como 67,2 e 67,1% (m m^{-1}), para produtos com e sem sal, respectivamente (TACO, 2011).

Para amostras de chocolate, os teores de lipídeos totais são definidos na ordem de 35% (ZAMBIAZI, 2010), embora dados da literatura expressem o percentual de gordura com valores entre 28 e 31% (m m^{-1}) para diferentes tipos de chocolate (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007; TORRES-MORENO *et al.*, 2015). Segundo a TACO, o teor de lipídeos em chocolates ao leite e amargos é da ordem de 30,3 e 29,9% (m m^{-1}), respectivamente (TACO, 2011).

2.3 Presença de elementos potencialmente tóxicos em margarina e chocolate: alterações na qualidade do produto e riscos à saúde humana

Os óleos vegetais e gorduras comestíveis desempenham um papel vital na nutrição humana, sendo que atualmente tem se dado atenção não somente aos seus compostos orgânicos, mas também para a presença de espécies inorgânicas (BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997). Assim, a determinação da concentração de metais e outros elementos em margarina justifica-se, tanto do ponto de vista de que alguns elementos têm importante papel metabólico no organismo humano, quanto pela preocupação referente à presença de elementos potencialmente tóxicos ao consumidor (SOUZA *et al.*, 2005; CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007).

Além dos aspectos nutricionais e toxicológicos, o teor de alguns elementos em óleos e gorduras está diretamente relacionado com a qualidade destes produtos, visto que a determinação da concentração elementar em nível de traço em tais amostras é conhecidamente uma forma de avaliar algumas características de qualidade do produto, como frescor, condições de armazenamento e adequabilidade ao consumo (MERTENS; SWINDELLS; TEASDALE, 1971; MORETTO; FETT, 1998; ANWAR *et al.*, 2004; SZLYK; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2004; SOUZA *et al.*, 2005). Como exemplo disso, podem ser citados os metais Fe, Cu, Ca, Mg, Co, Ni e Mn, conhecidos por aumentarem a taxa de oxidação de óleos ou gorduras, enquanto Cd, Cr, Pb, entre outros, apresentam características de toxicidade (MERTENS; SWINDELLS; TEASDALE, 1971; ANWAR *et al.*, 2004; SZLYK; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2004; SOUZA *et al.*, 2005; ANTHEMIDIS; ARVANITIDIS; STRATIS, 2005; YASAR; BARAN; ALKAN, 2012). Especialmente no caso dos óleos comestíveis, a determinação elementar é também utilizada como forma de detectar adulterações do produto, as quais geralmente são representadas pela adição de óleos com características inferiores e de baixo custo ao produto comercializado, acarretando em contaminações pela presença de metais (CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007).

A contaminação por metais e outros elementos em margarina pode acontecer a partir da matéria-prima (bioacumulação do solo, ou por pesticidas empregados no cultivo das plantas fornecedoras da matéria-prima para a obtenção do óleo), ou ocorrer durante o processo de produção ou armazenamento (SOUZA *et al.*, 2005;

ZEINER; STEFFAN; CINDRIC, 2005; YASAR; BARAN; ALKAN, 2012). No entanto, cabe destacar que a forma de contaminação mais comum é a resultante do processo de hidrogenação do óleo, previamente à fabricação da margarina (ANWAR *et al.*, 2004), no qual geralmente são empregados catalisadores a base de Ni, Ru, Rh, Pt ou Pd. Dentre eles, Ni é o de uso mais comum (MORETTO; FETT, 1998; SOLOMONS; FRAYHLE, 2001; GABROVSKA *et al.*, 2006).

Da mesma forma, o chocolate, amplamente consumido mundialmente e reconhecido como fonte de nutrientes e outros compostos benéficos à saúde (IEGGLI *et al.*, 2011 (b); WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013; YANUS *et al.*, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015), tem sido investigado quanto à presença de elementos potencialmente tóxicos ao organismo humano (DAHIYA *et al.*, 2005; RANKIN *et al.*, 2005; JALBANI *et al.*, 2009; IEGGLI *et al.*, 2011 (a); WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013; YANUS *et al.*, 2014). A contaminação de chocolate por elementos tóxicos é, geralmente, atribuída às partes metálicas dos instrumentos utilizados no processo de fabricação do produto, às embalagens em que os chocolates são estocados e, principalmente, aos ingredientes utilizados para a obtenção do produto (BECKETT, 1994; DAHIYA *et al.*, 2005; AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007; GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; REHMAN; HUSNAIN, 2012; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; YANUS *et al.*, 2014).

Assim, alguns ingredientes que participam do processo de fabricação do chocolate, como cacau em pó, manteiga de cacau, leite em pó, gordura vegetal e açúcar, têm sido também investigados quanto à concentração de elementos potencialmente tóxicos (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; MOUNICOU *et al.*, 2003; RANKIN *et al.*, 2005; GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; YANUS *et al.*, 2014; RAMTAHAL *et al.*, 2015). O cacau tem sido apontado por diversos autores como uma das principais fontes de contaminação do chocolate, por elementos que se apresentam em elevadas concentrações neste produto, geralmente devido às características do solo e processos de cultivo (DAHIYA *et al.*, 2005; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; REHMAN; HUSNAIN, 2012; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; YANUS *et al.*, 2014). Este fato corrobora com as maiores concentrações de alguns

elementos relatadas na literatura para chocolates que apresentam elevadas concentrações de cacau (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; DAHIYA *et al.*, 2005; RANKIN *et al.*, 2005; JALBANI *et al.*, 2007; JALBANI *et al.*, 2009; IEGGLI *et al.*, 2011 (a); REHMAN; HUSNAIN, 2012; WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; YANUS *et al.*, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015).

Dentre os elementos potencialmente tóxicos ao organismo humano que devem ser investigados em alimentos de amplo consumo, como margarinas e chocolates, encontram-se também alguns elementos essenciais à manutenção das funções fisiológicas normais, os quais podem ser prejudiciais se ingeridos em quantidades inadequadas. Nesse sentido, o *Institute of Medicine of the National Academies* (IOM) descreve sobre micronutrientes presentes em alimentos, com papel benéfico à saúde humana, mas que se ingeridos em excesso podem causar também inconvenientes ao organismo (IOM, 2002). Como exemplo, pode-se citar o Cu, componente de enzimas e necessário para o desenvolvimento correto do tecido conjuntivo, o qual se ingerido em excesso pode provocar danos ao fígado, como efeito adverso crítico (IOM, 2002; LIU; GOYER; WAALKES, 2012; CETESB, 2015). Assim também o Cr é um elemento reconhecido por melhorar a eficiência da insulina, potencializando sua ação em indivíduos com intolerância à glicose. Entretanto, sua ingestão acima dos limites recomendados na forma de Cr VI, é capaz de produzir irritação, além de ser um agente cancerígeno, mutagênico e promotor de disfunções hepáticas (IOM, 2002). Por sua vez, o Fe, responsável pelo transporte do oxigênio para os tecidos, e também empregado na prevenção à anemia, pode promover problemas gastrointestinais no organismo, se ingerido em excesso (IOM, 2002; LIU; GOYER; WAALKES, 2012). O Mo atua na formação de enzimas cuja deficiência pode resultar em anormalidades neurológicas. No entanto, Mo presente no organismo em concentrações superiores às recomendadas pode prejudicar a reprodução e crescimento dos indivíduos (IOM, 2001). O Zn é componente de várias enzimas estruturais, porém, em excesso, este elemento pode levar a manifestações tanto no trato intestinal como no pulmão (IOM, 2002; LIU; GOYER; WAALKES, 2012; CETESB, 2015).

Segundo Liu, Goyer e Waalkes (2012), Mn também pode ser mencionado como um elemento essencial ao organismo, por participar de processos

reprodutivos, manutenção da estrutura óssea e funcionamento do sistema nervoso. Porém, este elemento apresenta também toxicidade em determinados níveis de exposição, relacionadas principalmente a efeitos neurológicos e neuropsiquiátricos (CETESB, 2015). Da mesma forma, a exposição por via oral a elevados níveis de Co, um nutriente essencial em pequenas quantidades, pode ocasionar efeitos gastrointestinais, além de ser um potencial carcinogênico (CETESB, 2015).

São também relatados pelo IOM alguns micronutrientes considerados não essenciais ao organismo, mas que apresentam alguma relação com processos vitais. Como exemplo, pode-se citar o As, o qual quando ingerido em concentrações adequadas atua em processos de crescimento. Entretanto, o excesso deste elemento no organismo pode ser relacionado com encefalopatia, sintomas gastrointestinais, hepatotoxicidade, e ocorrência de câncer (IOM, 2002; SALGADO, 2008; LIU; GOYER; WAALKES, 2012; CETESB, 2015). O B tem função fisiológica relacionada com o metabolismo normal da vitamina D e com o sistema imunológico do organismo, apesar de ocasionar desconfortos gástricos, convulsões, depressão e colapso vascular, quando ingerido em excesso (IOM, 2002). Por sua vez, o V, que apresenta função semelhante à insulina, quando ingerido em quantidades elevadas pode causar efeitos gastrointestinais adversos (IOM, 2002; CETESB, 2015).

O Ni atua na regulação do conteúdo lipídico em tecidos e na síntese de fosfolípidos (NUNES, 2009), além de ser considerado essencial para animais devido sua relação com o crescimento do organismo (IOM, 2002). Entretanto, sabe-se que, dependendo da concentração ingerida, este elemento também pode causar efeitos tóxicos para os rins, suprimir a imunidade do organismo e ser cardiotóxico e cancerígeno. Além disso, é um dos alérgenos mais comuns, sendo que a ingestão ou as exposições cutâneas a este elemento podem levar à dermatite, e sua inalação causa complicações do trato respiratório (SAVCHENKO; MAKARYAN, 1999; SOUZA, 2007; NUNES, 2009; LIU; GOYER; WAALKES, 2012; CETESB, 2015).

Ainda, dentre os elementos a que o organismo humano encontra-se exposto através da alimentação, pode ser mencionado o Cd. Elevada exposição a este elemento tem sido relacionada com casos de danos renais, doenças pulmonares e cardiovasculares, osteoporose, e câncer (SALGADO, 2008; LIU; GOYER; WAALKES, 2012; CETESB, 2015). Da mesma forma, a exposição excessiva a Pb, pode ocasionar efeitos tóxicos que vão desde a inibição de enzimas até a produção

de patologias graves ou morte, geralmente relacionada a efeitos neurológicos, nefrológicos ou danos ao sistema cardiovascular (SALGADO, 2008; LIU; GOYER; WAALKES, 2012; CETESB, 2015). Ingestões excessivas de Al, por sua vez, são relacionadas a danos a pulmão, ossos e sistema nervoso central. Além disso, uma possível relação entre as concentrações de Al no organismo e a Doença de Alzheimer vem sendo estudada há décadas (SALGADO, 2008; LIU; GOYER; WAALKES, 2012).

Assim, baseado no fato de que a alimentação constitui uma importante via de exposição humana a elementos potencialmente tóxicos, junto a outras formas de exposição, como inalação e contato dérmico, é de suma importância a determinação elementar em alimentos em geral, incluindo margarinas e chocolates, a fim de investigar possíveis contaminações com representação de perigo para a saúde. Este controle é necessário, pois a ingestão de elementos potencialmente tóxicos, mesmo que em baixas concentrações, pode ser prejudicial quando realizada por longos períodos (ZHU *et al.*, 2011).

A regulamentação para margarinas quanto à constituição inorgânica, abrange poucos elementos. São estabelecidos limites máximos neste alimento, apenas para Fe (1500 ng g^{-1}), As (100 ng g^{-1}), Pb (100 ng g^{-1}), Ni (4000 ng g^{-1}) e Cu (100 ng g^{-1}). Estes limites são expressos individualmente pelo Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965, da Presidência da República (BRASIL - DECRETO 55871, 1965), CODEX STAN 32-1981, da *Food and Agriculture Organization and World Health Organization* (FAO/WHO - CODEX STAN 32, 1981), Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, do Ministério da Saúde (BRASIL - PORTARIA 685, 1998) e Resolução nº 42, de 29 de agosto de 2013, da ANVISA (ANVISA – RDC 42, 2013).

Para os chocolates, a CODEX expressa, através da norma 97/14, os limites máximos permitidos de As, Cu e Pb, como sendo da ordem de 500, 20000 e 1000 ng g^{-1} , respectivamente. Este mesmo comitê tem recomendações diferentes para chocolates que não contêm açúcar em sua composição, sendo que neste caso os limites máximos permitidos são de 1000, 35000 e 2000 ng g^{-1} , para As, Cu e Pb, respectivamente (FAO/WHO - CODEX ALINORM 97/14, 1997). Por sua vez, na legislação brasileira, representada pela Resolução nº 42, de 29 de agosto de 2013, da ANVISA, são expressos os limites máximos de concentração de As, Pb e Cd em chocolates contendo < 40% de cacau, como sendo de 200 ng g^{-1} para os três

elementos. Quando se tratam de chocolates com mais de 40% de cacau, os limites máximos expressos pela legislação brasileira são de 400 ng g⁻¹ para As e Pb, e 300 ng g⁻¹ para Cd (ANVISA – RDC 42, 2013).

Cabe ressaltar que, embora a legislação vigente para margarina e chocolate não limite a presença de muitos elementos potencialmente tóxicos nestes alimentos, órgãos como o IOM e a WHO recomendam níveis seguros de ingestão diários para vários elementos, de acordo com a idade, sexo e condição de gravidez ou lactação do consumidor. De forma geral, o IOM estabelece limites máximos de uma ingestão tolerável diária para adultos (19-70 anos) dos elementos B (20 mg), Cu (10 µg), Fe (45 mg), Mn (11 mg), Mg (350 mg), Mo (2 µg), Zn (40 mg), V (1,8 mg), Ni (1 mg) e Se (400 µg) (IOM, 2003). Da mesma forma, a WHO estabelece limites máximos de ingestão diária para adultos dos elementos Zn (45 mg), Se (400 µg), Cu (12 mg), Cr (250 µg), Ni (100 µg) e V (10 mg). Para Mn e B, este órgão estabelece faixas aceitáveis de ingestão diária (2-5 mg para Mn, e 1-13 mg para B), enquanto que para Pb, Cd, As, Al e Sn, são expressos limites máximos de ingestão semanal, de acordo com a massa corpórea do indivíduo (Pb: 25 µg kg⁻¹; Cd: 7 µg kg⁻¹; As: 15 µg kg⁻¹; Al: 7 mg kg⁻¹; e Sn: 14 mg kg⁻¹ (WHO, 1996).

Como pode ser observado, os limites máximos de ingestão de um mesmo elemento podem variar bastante dependendo do órgão regulamentador considerado. Além disso, é importante enfatizar que estas recomendações diárias de ingestão elementar consideram toda a exposição alimentar do indivíduo, não se restringindo a apenas um tipo de alimento.

2.3.1 Métodos analíticos para a determinação de elementos potencialmente tóxicos em alimentos com elevado teor de gordura

A partir do que foi descrito anteriormente, pode-se dizer que a disponibilidade de resultados confiáveis com relação à concentração de metais e outros elementos potencialmente tóxicos em óleos e gorduras comestíveis, como a margarina, é importante para que se possa inferir sobre as características nutricionais e toxicológicas do produto, bem como sobre sua qualidade (ANWAR *et al.*, 2004; CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007). Da mesma forma, para as amostras de chocolate, é de suma importância que se conheça a concentração dos elementos

potencialmente tóxicos, mesmo que em níveis de traço, nestes produtos amplamente consumidos mundialmente. Adicionalmente, no caso do chocolate, este produto é grandemente apreciado e consumido por crianças, o que torna o seu controle de qualidade ainda mais necessário (DAHIYA *et al.*, 2005; IEGGLI *et al.*, 2011 (b); VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014).

Entretanto, as determinações elementares em nível traço em margarinas e chocolates ainda constituem um desafio em Química Analítica, considerando o elevado teor de gordura que estas matrizes apresentam. Assim, além da simplicidade e adequabilidade à matriz da amostra, o método utilizado, idealmente, deve ter capacidade para determinação sensível e multielementar, ser rápido, preciso, exato, ter baixos custos operacionais, fornecer segurança ao analista e gerar a menor quantidade de resíduos possível (KRUG; NÓBREGA, 2010; NÓBREGA *et al.*, 2012).

Os trabalhos publicados na literatura, referentes a determinações elementares em alimentos com elevado teor de gordura, relatam a utilização de técnicas analíticas de determinação variadas, sendo que a maioria delas exige procedimento prévio de preparo da amostra, visando à eliminação da matriz orgânica. Os procedimentos de preparo de amostras relatados na literatura para amostras de óleos e margarinas incluem decomposição por via úmida (ELSON; BEM; ACKMAN, 1981; ANWAR *et al.*, 2004; SZLYK; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2004), decomposição assistida por radiação micro-ondas (ZEINER; STEFFAN; CINDRIC, 2005; CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007; ZHU *et al.*, 2011; LODYGA-CHRUSCINSKA; SYKULA-ZAJAC; OLEJNIK, 2012), dispersão ou preparo de emulsão (NASH; MOUNTS; KWOLEK, 1983; ANTHEMIDIS; ARVANITIDIS; STRATIS, 2005; SOUZA *et al.*, 2005; IEGGLI *et al.*, 2011 (c)), extração (SOULIOTIS, 1964; ELSON; BEM; ACKMAN, 1981; ANWAR *et al.*, 2004), entre outros com menor aplicação.

Por sua vez, como exemplos de técnicas de determinação nestas amostras, podem ser citadas a espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (FAAS) ou forno de grafite (GF AAS) (ELSON; BEM; ACKMAN, 1981; NASH; MOUNTS; KWOLEK, 1983; ANWAR *et al.*, 2004; NASH; SZLYK; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2004; ZEINER; STEFFAN; CINDRIC, 2005; CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007; IEGGLI *et al.*, 2011 (c); ZHU *et al.*, 2011), espectrometria de

emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (ANTHEMIDIS; ARVANITIDIS; STRATIS, 2005; SOUZA *et al.*, 2005; ZEINER; STEFFAN; CINDRIC, 2005; CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007; ZHU *et al.*, 2011), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (SOUZA, 2007; LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2011), cromatografia de íons (IC) (BULDINI, FERRI, SHARMA, 1997), análise por ativação neutrônica (NAA) (SOULIOTIS, 1964), entre outros. As técnicas analíticas de determinação baseadas em espectrometria de absorção atômica (AAS) ainda são as mais empregadas atualmente para a determinação de metais em óleos e margarinas, embora seu uso tenha reduzido recentemente, com o advento das técnicas que empregam plasma indutivamente acoplado (ICP) (YASAR; BARAN; ALKAN, 2012).

Com relação às determinações elementares em chocolates, assim como observado para as amostras de óleo e margarina, na maioria dos relatos da literatura os experimentos são conduzidos utilizando as técnicas analíticas de determinação baseadas em AAS (JALBANI *et al.*, 2007; GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; IEGGLI *et al.*, 2011 (a); REHMAN; HUSNAIN, 2012; BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; RAMTAHAL *et al.*, 2015). Entretanto, o uso da ICP-MS para a determinação elementar nestas amostras tem se destacado (RANKIN *et al.*, 2005; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; YANUS *et al.*, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015), devido principalmente a sua elevada sensibilidade e capacidade de determinações sequenciais (BECKER, 2007), enquanto que a ICP OES ainda encontra pequena aplicação, sendo utilizada somente para a determinação dos elementos presentes em maiores concentrações em chocolates (VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015).

No que se refere ao preparo das amostras de chocolate previamente à determinação dos analitos, são relatadas a utilização de decomposição por via seca (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; GÜLDAS, 2008), formação de suspensão ou emulsão (KARADJOVA *et al.*, 2000; IEGGLI *et al.*, 2011 (a); IEGGLI *et al.*, 2011 (b)), extração (VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015), ou decomposição ácida por via úmida, com aquecimento convencional (KARADJOVA *et al.*, 2000; DAHIYA *et al.*, 2005; GÜLDAS, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; REHMAN; HUSNAIN, 2012; YANUS *et al.*, 2014; RAMTAHAL *et al.*, 2015) ou assistido por radiação-micro-ondas (GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; SCANCAR;

ZULIANI; MILACIC, 2013; BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). Entretanto, é importante destacar que quando a ICP-MS é utilizada para a determinação dos analitos, os procedimentos de preparo das amostras de chocolate ainda são restritos.

Cada técnica analítica de determinação utilizada tem requisitos especiais, vantagens e desvantagens, segundo seu princípio básico. Desta forma, a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) apresenta-se como uma das técnicas mais utilizadas para as determinações elementares em margarina e chocolate, devido suas características de elevada sensibilidade, adequabilidade à introdução de amostras de forma direta ou como emulsão, além de requerer pequena quantidade de amostra para análise (IEGGLI *et al.*, 2011 (a); YASAR; BARAN; ALKAN, 2012). Ainda, esta técnica não sofre interferências por ácidos concentrados, ou presença de carbono característico de decomposições incompletas, o que faz com que seja adequada ao uso após o preparo das amostras em sistemas de decomposição com baixa eficiência, ou que utilizem ácidos concentrados ou outros reagentes oxidantes (GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; REHMAN; HUSNAIN, 2012; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014). Entretanto, pode-se destacar como principais desvantagens do uso desta técnica a impossibilidade de determinações elementares sequenciais, e o tempo elevado de análise, quando comparado às técnicas que utilizam ICP. Além disso, quando são realizadas análises diretas de sólidos, ou emulsões, tem-se ainda as dificuldades de calibração do equipamento, devido a não disponibilidade de padrões com estas características (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). É importante destacar que, mais recentemente, as determinações multielementares sequenciais têm sido realizadas por AAS, mais precisamente através do uso de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), mediante o uso de uma única fonte de radiação para todos os elementos (BORGES *et al.*, 2005).

A técnica de ICP OES apresenta como principais características a rapidez, a capacidade de determinação multielementar simultânea e a reduzida interferência de matriz. Entretanto, possui menor poder de detecção se comparado à ICP-MS e GF AAS, de forma que sua aplicação na determinação elementar em amostras de

margarina e chocolate é dependente da concentração dos analitos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015).

Por sua vez, a técnica de ICP-MS apresenta a exigência de um preparo de amostra eficiente previamente à determinação dos analitos, a fim de eliminar a matriz da amostra, é suscetível a interferências pelo uso de ácidos concentrados, e apresenta limitações quanto à análise direta de amostras ou emulsões, o que a torna menos atrativa do que a GF AAS quando se almeja análise com mínima manipulação da amostra (STEWART; OLESIK, 1998; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BECKER, 2007; NUNES, 2009; YASAR; BARAN; ALKAN, 2012). Entretanto, essa técnica apresenta-se com elevada sensibilidade, limites de detecção (LOD) inferiores aos obtidos com o emprego de outras técnicas, rapidez de análise, e capacidade de determinações multielementares sequenciais (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BECKER, 2007; NUNES, 2009).

É importante ressaltar também que a técnica de ICP-MS não é livre de problemas durante as determinações elementares, devido a ocorrência de interferências denominadas como espectrais ou não espectrais. Dentre as interferências não espectrais, podem ser mencionadas a ocorrência de discriminações de massa na entrada do separador; a repulsão eletrostática das cargas no cone de amostragem, ocasionando desvios na trajetória dos íons; e a ocorrência de depósitos, dificuldades no transporte de amostra, entupimentos e interferências na ionização dos analitos, causados pela elevada viscosidade da solução de amostra, devido ao uso de elevadas concentrações de ácido, ou pela presença de matéria orgânica não decomposta (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BECKER, 2007).

Como interferências espectrais, podem ser mencionadas as interferências isobáricas, poliatômicas ou por íons de dupla carga. A interferência isobárica acontece quando dois elementos possuem isótopos de mesma carga como, por exemplo ^{113}In e ^{113}Cd , ou ^{40}Ar e ^{40}Ca , e pode ser corrigida pela escolha de outro isótopo livre de superposição isobárica. A interferência por íons poliatômicos acontece quando espécies presentes no plasma reagem entre si formando um novo íon como, por exemplo, $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, os quais interferem nas determinações de ^{63}Cu , ^{75}As , ^{51}V , ^{52}Cr , respectivamente. A correção deste tipo de

interferência se dá pela utilização de um equipamento de alta resolução, ou o emprego de celas de colisão ou reação. Por sua vez, as interferências por íons dupla carga acontecem com elementos de baixo potencial de ionização, os quais se ionizam duas vezes formando íons com carga dupla, com consequentes espectros com metade da massa esperada, o que pode gerar perda de sinal ou interferências na determinação de outros elementos. Este tipo de interferência pode ser corrigida pelo aumento da vazão do gás carregador e/ou diminuição da potência de radiofrequência (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BECKER, 2007; NUNES, 2009; GRINDLAY *et al.*, 2013).

De forma geral, o principal inconveniente do uso das técnicas de espectrometria atômica com ICP, sendo este mais evidente na técnica de ICP-MS, é a necessidade de um pré-tratamento da amostra com o intuito de minimizar a carga orgânica introduzida no equipamento, visto que esta pode diminuir a estabilidade do plasma, reduzir a energia disponível para ionização dos analitos, facilitar a formação de depósitos de carbono em partes internas do instrumento, ou promover interferências nas determinações (BECKER, 2007; SOUZA, 2007; GRINDLAY *et al.*, 2013). Desta forma, a sua utilização para determinações elementares em margarinas e chocolates, a qual é desejável, dadas as vantagens que apresenta frente a outras técnicas analíticas de determinação, é dependente de um preparo de amostras adequado e eficiente.

2.4 Preparo de amostras

Dentro da sequência analítica, uma das etapas de maior destaque é o preparo da amostra, visto que se trata da etapa que pode ser considerada como a mais demorada, de maior custo, e onde se cometem mais erros, os quais frequentemente limitam a exatidão que pode ser alcançada em uma análise (KRUG; NÓBREGA, 2010). De forma geral, nesta etapa são realizados os procedimentos necessários para a conversão da amostra em uma forma adequada para que a espécie química de interesse possa ser determinada. Entretanto, cabe salientar que existem situações em que a amostra pode ser analisada sem qualquer tipo de pré-tratamento (KRUG; NÓBREGA, 2010).

Com relação à determinação de elementos em amostras de natureza orgânica, é importante ressaltar que, normalmente, esta matriz exige a transformação dos analitos presentes em uma forma inorgânica simples. Geralmente, a amostra original não é adequada para análise direta devido a fatores diversos, representados principalmente pela característica de heterogeneidade dos materiais biológicos (MAGALHÃES *et al.*, 2010). Assim, de maneira geral, não existe um procedimento de preparo de amostras único que possa ser utilizado para diferentes tipos de matrizes. A escolha do procedimento está relacionada com o tipo e faixa de concentração do analito, bem como com a técnica de determinação a ser utilizada.

No campo das análises em margarinas e chocolates, têm se destacado como técnicas de preparo de amostras o preparo de suspensões, e as decomposições por via úmida tanto com aquecimento convencional, como assistido por radiação micro-ondas. Entretanto, quando se almeja a determinação elementar nestas amostras utilizando a técnica de ICP-MS, a utilização de sistemas de decomposição assistida por radiação micro-ondas associados ao uso de radiação ultravioleta (FLORIAN; KNAPP, 2001), ou à utilização de elevadas pressões e temperaturas (NÓBREGA *et al.*, 2012), podem ser consideradas importantes alternativas aos métodos usualmente utilizados. A descrição destas técnicas de preparo de amostras, até então nunca aplicadas para a decomposição de produtos alimentares com elevado teor de gordura, como margarinas e chocolates, será feita a seguir.

É importante também destacar, que a utilização destas técnicas de preparo de amostras mencionadas pode permitir a utilização de soluções ácidas diluídas para a satisfatória decomposição da matéria orgânica, evitando assim o uso de reagentes concentrados (NÓBREGA *et al.*, 2012; MESKO *et al.*, 2015; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014). Dessa forma, o uso de soluções diluídas representa mais uma vantagem destas técnicas de preparo de amostras, frente às demais técnicas, quando se pretende a determinação dos analitos por ICP-MS, considerando a suscetibilidade desta técnica de determinação a interferências pelo uso de ácidos concentrados (STEWART; OLESIK, 1998; BECKER, 2007).

A eficiência de um método de decomposição de amostras pode ser avaliada pela determinação da quantidade de carbono remanescente ao final do procedimento, a qual pode ser expressa em concentração de carbono em solução,

percentual de carbono por massa de amostra decomposta, ou mais frequentemente, por percentual de carbono não oxidado em relação ao carbono inicial, denominado teor de carbono residual (RCC). Esta quantidade de carbono, não eficientemente oxidado, pode ser quantificada utilizando, por exemplo, ICP OES (WURFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989; KRUSHEVSKA *et al.*, 1992; PEREIRA *et al.*, 2013).

2.4.1 Preparo de suspensões ou emulsões

As suspensões utilizadas em análises químicas são representadas por fluidos heterogêneos contendo partículas maiores que 1 μm dispersas em suspensão por agitação mecânica, as quais tendem a sedimentar por repouso, quando agentes estabilizantes não são empregados (SANTOS JR.; KRUG, 2010). Como principais vantagens do uso de suspensões em Química Analítica, alternativamente aos processos de decomposição ácida convencionais, podem ser mencionadas (i) a diminuição do tempo de preparo da amostra, (ii) o menor consumo de reagentes, (iii) facilidade de preparo, e (iv) menor possibilidade de contaminação. Entretanto, o emprego da amostragem de suspensões também traz características restritivas como, por exemplo, (i) a falta de homogeneidade da suspensão, (ii) a dificuldade de obtenção de materiais de referência certificados (CRMs) adequados para a calibração, (iv) a impossibilidade de emprego em algumas técnicas de determinação, devido ao tamanho das partículas, (v) a diminuição da vida útil de atomizadores em AAS, quando comparada à utilização de amostras decompostas, e (vi) a baixa estabilidade da suspensão, o que pode comprometer a precisão dos resultados (SANTOS JR.; KRUG, 2010; NOMURA; OLIVEIRA, 2010).

Apesar das limitações apresentadas, determinações elementares a partir de amostragem direta de suspensão têm sido relatadas, por exemplo, em amostras biológicas (JANUZZI; KRUG; ARRUDA, 1997; LIMA *et al.*, 1999) e alimentos (VIÑAS *et al.*, 1993), empregando como técnica de determinação dos analitos a GF AAS ou a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). Entretanto, outras técnicas espectrométricas envolvendo acoplamento indutivo de plasma (ICP) podem também ser aplicadas (SANTOS JR.; KRUG, 2010).

No caso de amostras de óleos ou gorduras comestíveis, é comum a preparação de dispersões da amostra na forma de emulsões, empregando surfactantes ou outros reagentes com vistas a obtenção de maior estabilidade (SOUZA *et al.*, 2005; VIANA *et al.*, 2014). Entretanto, como descrevem Yasar, Baran e Alkan (2012), apesar das vantagens relatadas, como economia de reagentes, segurança, baixos níveis de contaminações e reduzido tempo de preparo, o uso deste procedimento pode não ser bem sucedido, principalmente quando se usam técnicas de determinação de analito com ICP, visto que nem sempre ocorre a destruição completa da matriz da amostra no plasma. Além disso, um grande desafio quando se trata da aplicação de emulsões em análises químicas é a obtenção de estabilidade suficiente para que a análise possa ser realizada (SOUZA *et al.*, 2005; VIANA *et al.*, 2014).

Nash, Mounts e Kwolek (1983) realizaram a determinação de Ni, Cr Cu e Fe em óleos vegetais, gorduras e margarinas por GF AAS, após preparo de emulsões. Da mesma forma, Souza (2007) empregou o preparo de emulsões seguido de GF AAS para a determinação de Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, V, Zn em margarinas e óleos vegetais. Determinações elementares em emulsões de margarina utilizando F AAS foram relatadas por Ieggli (2011 (c)), quando a autora quantificou Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe, os quais estavam presentes em concentrações elevadas na amostra. O preparo de emulsões de óleos vegetais, margarinas e manteigas, seguido por determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Mn por ICP OES foi relatado por Souza *et al.* (2005). Porém, neste caso, as determinações foram realizadas em amostras fortificadas, considerando que os LODs obtidos pelos autores foram superiores às concentrações dos elementos nas amostras.

O preparo de emulsões também tem sido relatado para amostras de chocolate, seguido por determinações elementares utilizando técnicas de AAS (IEGGLI *et al.*, 2011 (a); IEGGLI *et al.*, 2011 (b)). Elementos presentes em elevadas concentrações em chocolates, como Na, K, Ca, Mg, Zn e Fe foram determinadas por Ieggli *et al.* (2011 (b)) por F AAS, após preparo de emulsão. Este mesmo grupo de pesquisa relatou também o uso de GF AAS após preparo de microemulsão, para a quantificação de elementos traço, como Al, Cu e Mn, em chocolates branco, ao leite e à base de cacau (IEGGLI *et al.*, 2011 (a)).

2.4.2 Decomposição por via úmida

Os procedimentos de decomposição por via úmida constituem uma das formas de preparo de amostras comumente aplicadas para amostras em geral. Neste procedimento, a decomposição de materiais orgânicos ou biológicos é realizada mediante aquecimento, geralmente em presença de ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos oxidantes, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. Assim, tem-se a oxidação completa da maioria das amostras, deixando os analitos na solução ácida em formas inorgânicas apropriadas para análise. No entanto, é importante ressaltar que este resultado positivo depende do quão oxidantes forem os ácidos utilizados, do tempo e temperatura do aquecimento empregado, e das características da amostra (FLORES *et al.*, 2010).

Os ácidos com propriedades oxidantes comumente empregados nas decomposições por via úmida de amostras orgânicas ou biológicas são o ácido nítrico, ácido sulfúrico ou ácido perclórico. Com exceção do HClO_4 , os demais ácidos podem ser usados individualmente. Porém, é bastante comum a utilização destes ácidos misturados entre si, ou combinados com peróxido de nitrogênio, como forma de elevar o poder oxidante do meio (FLORES *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2014). O HNO_3 concentrado é o reagente mais frequentemente utilizado nos procedimentos de decomposição por via úmida, sendo aplicado para o preparo de amostras orgânicas variadas. Seu uso apresenta algumas vantagens como: a solubilização da maioria dos elementos, e a possibilidade de ser obtido comercialmente com pureza adequada (FLORES *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2014).

A decomposição por via úmida em frascos abertos é um dos métodos mais antigos e mais aplicados para a decomposição de amostras orgânicas. Entretanto, exige atenção do operador devido ao risco de trabalhar com substâncias oxidantes em sistema aberto e, para que bons resultados sejam alcançados, é necessário a escolha criteriosa do ácido ou mistura a serem empregados, visto que deles depende a taxa e a extensão da decomposição obtida. Além disso, cabe destacar que a escolha do agente oxidante utilizado também deve estar de acordo com a técnica de determinação a ser empregada (FLORES *et al.*, 2010).

Como vantagens da decomposição por via úmida em sistemas abertos, em relação aos sistemas de decomposição em frascos fechados, podem ser citadas a

decomposição de elevadas massas de amostra, visto que o sistema opera em pressão atmosférica e não há riscos de explosão, e a possibilidade da adição de reagentes durante a etapa de decomposição (MATUSIEWICZ, 2003; FLORES *et al.*, 2010). Entretanto, embora a decomposição por via úmida em sistema aberto seja amplamente aplicada para a determinação elementar de uma variedade de amostras como, por exemplo, previamente à determinação de metais e semi metais em amostras de óleos vegetais, margarinas e chocolates (ELSON; BEM; ACKMAN, 1981; ANWAR *et al.*, 2004; SZLYK; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2004; DAHIYA *et al.*, 2005; GÜLDAS, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; YANUS *et al.*, 2014; RAMTAHAL *et al.*, 2015), existem inconvenientes inerentes ao procedimento, os quais o deixam em desvantagem quando comparado, por exemplo, aos procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas (YASAR; BARAN; ALKAN, 2012). Um dos inconvenientes do uso de decomposição por via úmida em sistema aberto é a necessidade do uso de elevadas quantidades de reagentes oxidantes, ou misturas de reagentes, sempre na forma concentrada. Além disso, também pode ser considerada uma desvantagem o elevado tempo necessário para que ocorra a degradação da matéria orgânica e, em muitos casos, a ocorrência de decomposições incompletas (MATUSIEWICZ, 2003; FLORES *et al.*, 2010; YASAR; BARAN; ALKAN, 2012). Nesse sentido, é importante ressaltar que o conhecimento da eficiência de decomposição de um método só pode ser obtido pela detecção e identificação de material orgânico residual presente na solução ácida ao final do procedimento (FLORES *et al.*, 2010).

Os sistemas de decomposição por via úmida realizados em frascos fechados apresentam vantagens em relação aos frascos abertos, tais como a presença de uma atmosfera isolada e fechada, reduzindo a possibilidade de contaminações e a perda de espécies voláteis, e a maior eficiência de decomposição da matéria orgânica, promovida pelo aumento da temperatura de ebulição dos reagentes, decorrente de elevações de temperatura e pressão interna dos frascos. Entretanto, a elevação da pressão nos sistemas fechados aumenta os riscos de explosão, além de limitar a massa de amostra a ser decomposta (MATUSIEWICZ, 2003; FLORES *et al.*, 2010).

2.4.3 Decomposição assistida por radiação micro-ondas

Desde a década de 90, o número de aplicações envolvendo o uso de radiação micro-ondas para o preparo de amostras variadas tem crescido, se expandindo nos diversos ramos da química (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Neste sentido, Luque-Garcia e Castro (2003) atribuem o advento do uso da radiação micro-ondas à sua alta eficiência para transferência de calor, acelerando assim a etapa de decomposição da amostra.

A radiação micro-ondas é uma radiação não ionizante, com energia muito menor do que a necessária para promover a quebra das ligações das moléculas orgânicas comuns. Porém a alta eficiência alcançada em procedimentos de decomposição de amostras assistidos por radiação micro-ondas é resultante da interação dessa radiação eletromagnética com íons dissolvidos e solvente, provocando os fenômenos de migração iônica e rotação de dipolos, respectivamente. Estes dois processos ocasionam um movimento molecular no material, contribuindo para o aquecimento deste (ARRUDA; SANTELLI, 1997; BULDINI; RICCI; SHARMA, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2010; MELLO; BARIN; GUARNIERI, 2014).

As decomposições assistidas por radiação micro-ondas (MW-AD) podem ser promovidas em sistemas abertos ou fechados, sendo que este último é o mais recomendado, principalmente para decomposições com vistas à determinação de elementos voláteis. As principais vantagens de uma decomposição assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado são: (i) a maior eficiência de decomposição em altas temperaturas, se comparado ao sistema com aquecimento convencional, (ii) redução do risco de perda de analitos voláteis, (iii) menores contaminações pelo ambiente, e (iv) menor consumo de reagentes de alta pureza, visto que não há necessidade de acréscimo ou reposição destes durante a decomposição (KORN *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2014).

Por outro lado, como os demais sistemas de decomposição em frascos fechados, o sistema traz algumas desvantagens, representadas principalmente pela limitação da massa de amostra a ser decomposta, visto que pode ocorrer aumento da pressão interna dos frascos de decomposição, e o alto custo de instrumentação se comparado à decomposição por via úmida com aquecimento convencional

(BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997; SOUZA *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2010; YASAR; BARAN; ALKAN, 2012).

A decomposição assistida por radiação micro-ondas tem sido utilizada para o preparo de amostras de óleos vegetais e gorduras comestíveis (CINDRIC; ZEINER; STEFFAN, 2007; ANSARI *et al.*, 2009; LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2011) visando a posterior determinação elementar por técnicas analíticas diversas como, por exemplo, ICP OES e GF AAS. Amostras de chocolate pertencentes a tipos variados também têm sido digeridas em sistemas assistidos por radiação micro-ondas, previamente a determinação dos analitos por técnicas baseadas em AAS (GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014). É importante ressaltar que na imensa maioria das decomposições de margarina ou chocolate utilizando micro-ondas relatadas na literatura, é utilizado HNO_3 concentrado, ou mistura deste com outro ácido forte ou com reagente oxidante.

Técnicas espectrométricas utilizando ICP são também relatadas para determinações elementares em amostras de chocolate digeridas em sistemas assistidos por radiação micro-ondas (SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). Scancar, Zuliani e Milacic (2013) descrevem em seu trabalho a determinação de Ni em chocolate por ICP-MS, após a decomposição assistida por radiação micro-ondas utilizando uma mistura de reagentes concentrados (HNO_3 , HF e H_2O_2). Da mesma forma, no trabalho de Villa *et al.* (2015), a determinação de vários elementos é realizada por ICP OES e ICP-MS, após decomposição assistida por radiação micro-ondas, como comparação a um procedimento de extração com solução ácida quente, proposto pelos autores. Nesse caso, os autores promovem a decomposição assistida por radiação micro-ondas das amostras de chocolate utilizando uma mistura de 4 ml de HNO_3 e 2 ml de H_2O_2 , ambos na forma concentrada, com 2 ml de H_2O . Esta pode ser considerada a primeira utilização de solução oxidante diluída para a decomposição de chocolate utilizando esta técnica de preparo de amostras, considerando o volume de água adicionado ao sistema (VILLA *et al.*, 2015).

2.4.4 Decomposição assistida por radiação micro-ondas e radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta geralmente possui energia suficiente para promover transições eletrônicas nas ligações químicas de uma série de compostos, especialmente orgânicos. A partir desta absorção de energia, há a formação de espécies excitadas, instáveis, que evoluem por processos não fotoquímicos resultando em rearranjos internos, ionização ou dissociação das ligações químicas. Com a cisão homolítica destas ligações há a formação de radicais livres (moléculas dotadas de um elétron desemparelhado em um de seus orbitais externos) extremamente reativos, com característica de potente oxidante, receptor de elétrons de moléculas orgânicas. De modo geral, o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) pode ser considerado a principal espécie oxidante formada (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996; NOGUEIRA; CAVICCHIOLI; KAMOGAWA, 2010; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014). Diversos mecanismos são propostos para a decomposição da matéria orgânica pelos radicais livres, sendo que para moléculas alifáticas o processo se dá por sucessivas clivagens, resultando na decomposição do composto orgânico, com consequente diminuição do teor de carbono da amostra (NOGUEIRA; CAVICCHIOLI; KAMOGAWA, 2010).

A partir disto, visando decomposições mais eficientes de amostras com matrizes orgânicas de difícil decomposição, Florian e Knapp (2001), propuseram um procedimento de preparo de amostras utilizando simultaneamente as radiações micro-ondas e ultravioleta. Nesse procedimento, denominado decomposição assistida por radiação micro-ondas e radiação ultravioleta (MW-UV), são utilizadas lâmpadas de emissão de radiação ultravioleta inseridas dentro dos frascos de decomposição convencional em forno micro-ondas, como apresentado na Figura 3.

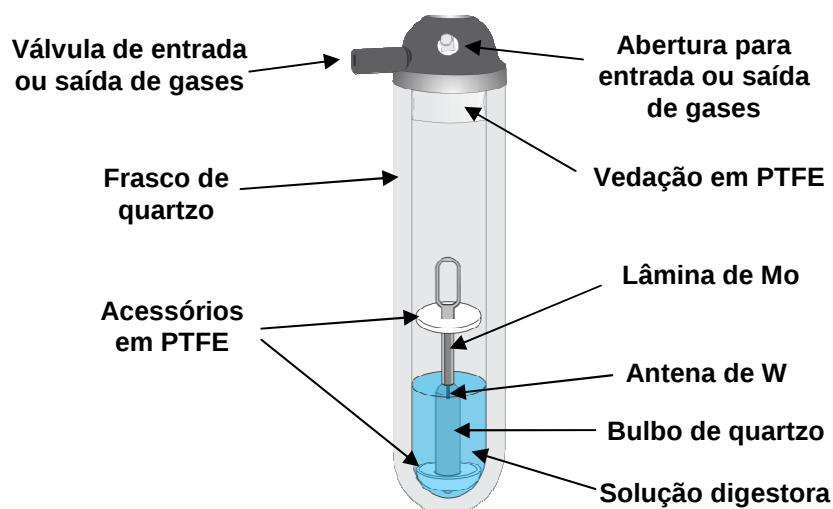


Figura 3 – Frasco de quartzo e lâmpada de emissão de radiação ultravioleta utilizados no procedimento de decomposição de amostras assistido pelas radiações micro-ondas e ultravioleta (adaptado de *Instruction Sheet B83IB51A*, Anton Paar, <http://www.anton-paar.com>).

Como observado na Figura 3, a lâmpada de emissão de radiação UV, denominada lâmpada de descarga sem eletrodos, possui uma lâmina de Mo, conectada a uma antena de W. A radiação micro-ondas é absorvida pelo Mo, e transmitida para a antena de W que libera uma descarga elétrica no interior do bulbo da lâmpada preenchida com vapor de Cd a baixa pressão, emitindo assim radiação UV no interior do frasco (FLORIAN; KNAPP, 2001; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014). Desta forma, as lâmpadas de emissão de radiação ultravioleta são ativadas pela radiação micro-ondas e, a partir disto tem-se um interessante sinergismo entre o efeito térmico e a ação fotoquímica, capaz de promover elevada eficiência de decomposição (NOGUEIRA; CAVICCHIOLI; KAMOGAWA, 2010). Uma ilustração do sistema de decomposição assistido pelas duas radiações é apresentada na Figura 4. É importante ressaltar que nesse sistema a amostra a ser decomposta sofre a ação simultânea de ambas as radiações, o que tem sido relacionado com as satisfatórias decomposições obtidas quando o sistema é utilizado (FLORIAN; KNAPP, 2001; MESKO *et al.*, 2015).

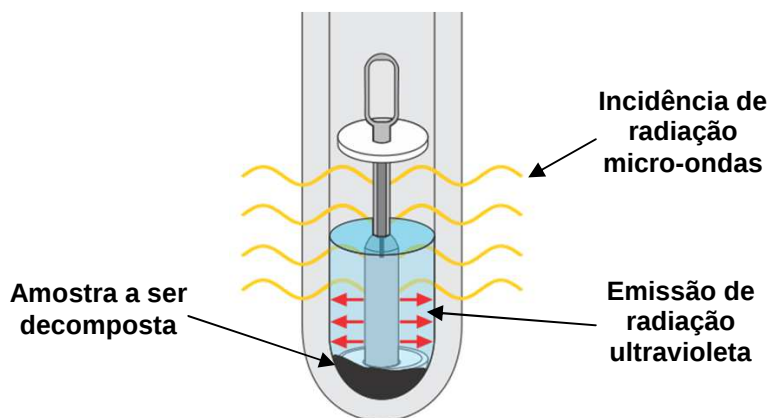


Figura 4 – Ilustração do interior do frasco de quartzo no sistema de decomposição de amostras assistido pelas radiações micro-ondas e ultravioleta.

As principais vantagens do uso da decomposição por MW-UV, descritas por Pereira, Wiltsche e Knapp (2014), quando comparadas aos sistemas convencionais de decomposição com UV são a possibilidade de associar elevadas temperaturas e reações fotoquímicas, o baixo custo do sistema, e a máxima absorção de UV pela solução de decomposição, considerando que as lâmpadas de emissão de radiação UV encontram-se dispostas dentro do frasco reacional (FLORIAN; KNAPP, 2001; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014).

Ainda, o uso desta combinação entre as radiações micro-ondas e ultravioleta para o preparo de amostras, fornece digeridos com menores teores de C, e em menor tempo do que as decomposições realizadas em sistemas que utilizam somente uma das radiações. Além disso, este sistema permite a utilização de soluções diluídas, inclusive sem a necessidade de utilizar reagentes oxidantes auxiliares (PEREIRA *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Entretanto, como desvantagens, são relatadas a impossibilidade de ativar as lâmpadas de emissão de radiação UV em baixas temperaturas, a necessidade de atenção quanto a amostras inflamáveis, e a possibilidade de superaquecimento da lâmpada com consequente prejuízo à emissão de radiação UV (FLORIAN; KNAPP, 2001; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014).

É importante enfatizar que existem na literatura poucos trabalhos utilizando este procedimento de decomposição de amostras (FLORIAN; KNAPP, 2001; LIMBECK, 2006; PEREIRA *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015), sendo que em nenhum deles foi utilizada amostra com elevado teor de gordura,

como margarinas e chocolates. Em suas primeiras aplicações, a MW-UV foi utilizada para o preparo de leite em pó desnatado (FLORIAN; KNAPP, 2001) e água (LIMBECK, 2006), visando a posterior determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP OES ou técnicas baseadas em AAS. A decomposição de petróleo bruto por MW-UV visando a posterior determinação de elementos terras raras por ICP OES também é relatada na literatura (PEREIRA *et al.*, 2013), bem como, mais recentemente, a decomposição de coque de petróleo para a determinação de Ni, V e S, utilizando esta mesma técnica de determinação (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A MW-UV também foi utilizada recentemente para a decomposição de algas marinhas, com posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS (MESKO *et al.*, 2015), sendo esta a primeira aplicação desta técnica de determinação em digeridos em sistema assistido pelas radiações micro-ondas e ultravioleta. Além disso, essa foi também a única aplicação da MW-UV para a decomposição de massas de 0,7 g de amostras utilizando apenas HNO₃ diluído como solução digestora, sem a adição de reagentes oxidantes auxiliares como verificado nos outros trabalhos.

2.4.5 Decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação

O sistema de decomposição de amostras em câmara única de reação (SRC) foi desenvolvido recentemente como um avanço dos sistemas de decomposição de amostras assistidos por radiação micro-ondas (NÓBREGA *et al.*, 2012; MATUSIEWICZ, 2014). Este sistema, que permite temperatura e pressão de 300 °C e 199 bar, respectivamente, tem como principais vantagens a capacidade de decomposição de elevadas massas de amostra, a obtenção de digeridos compatíveis com variadas técnicas de determinação, segurança ao operador, facilidade de uso, concordância com os princípios de Química Verde e alta frequência analítica. Além disso, pode também ser mencionada como vantagem do sistema a possibilidade de decomposição em uma mesma rodada de variadas massas de amostra, ou amostras com diferentes matrizes (NÓBREGA *et al.*, 2012; MATUSIEWICZ, 2014; ULTRAWAVE – Single Reaction Chamber, Milestone, <http://www.milestonesci.com>).

No sistema SRC, apresentado na Figura 5, os frascos de decomposição são dispostos fixos em um rotor, dentro de uma câmara de reação contendo uma solução composta principalmente por água e reagente oxidante. Esta câmara, que atua tanto como uma cavidade para distribuição da radiação micro-ondas, como um vaso de reação, é pressurizada com gás inerte, com o objetivo de manter os frascos de decomposição fechados, prevenir ebulições e projeções, e eliminar a possibilidade de contaminações. A radiação micro-ondas é distribuída eficientemente no sistema por uma fonte posicionada na base da câmara de reação (NÓBREGA *et al.*, 2012; MATUSIEWICZ, 2014; MULLER *et al.*, 2014; ULTRAWAVE – Single Reaction Chamber, Milestone, <http://www.milestonesci.com>).

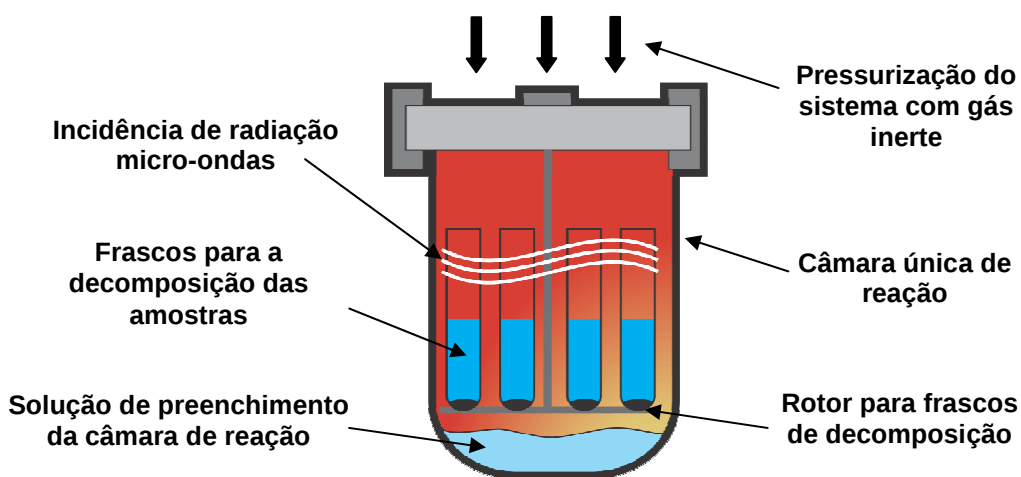


Figura 5 – Sistema de decomposição de amostras em câmara única de reação (adaptado de Ultrawave – Single Reaction Chamber (SRC), Milestone, <http://www.milestonesci.com>).

Os relatos da literatura, referentes a utilização do sistema SRC, indicam a possibilidade de decomposição de amostras variadas utilizando HNO_3 concentrado, misturas ácidas, ou solução ácida diluída acrescida de H_2O_2 , com a finalidade de suprir a necessidade de oxigênio no interior dos frascos, considerando que a pressurização do sistema com oxigênio deve ser evitada. Segundo esses relatos, o sistema SRC tem promovido decomposições eficientes das amostras orgânicas, permitindo a obtenção de digeridos com reduzidos teores de carbono em solução (NÓBREGA *et al.*, 2012; MULLER *et al.*, 2014; MULLER *et al.*, 2015).

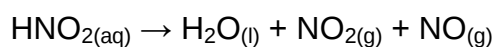
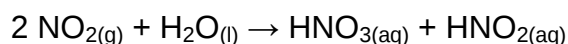
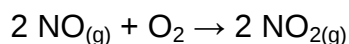
Nóbrega *et al.* (2012) utilizou o sistema de decomposição por SRC para o preparo de materiais de referência certificados de folhas de macieira, fígado bovino e leite em pó integral, para posterior determinação elementar por ICP OES ou ICP-MS. Neste procedimento os autores utilizaram HNO_3 diluído, acrescido de H_2O_2 (NÓBREGA *et al.*, 2012). Posteriormente, o sistema foi aplicado para a decomposição de nozes utilizando HNO_3 concentrado, para posterior determinação de diversos elementos tóxicos por ICP OES (MULLER *et al.*, 2014), bem como para a decomposição de princípios ativos farmacêuticos, mediante o uso deste mesmo reagente concentrado, ou mistura de ácidos, com subsequente determinação de impurezas elementares por ICP-MS (MULLER *et al.*, 2015). Entretanto, não há na literatura relatos da utilização de SRC para a decomposição de amostras com elevado teor de gordura, como por exemplo, margarina e chocolate.

2.4.6 Uso de ácidos diluídos no preparo de amostras

O uso de ácidos diluídos na etapa de preparo de amostras orgânicas previamente as determinações elementares é desejável por diversos fatores, dentre eles a segurança, a menor geração de resíduos, a minimização de danos aos equipamentos de determinação, a redução de custos e a obtenção de menores valores para os brancos analíticos. Além disso, digeridos com menor acidez também são atrativos quando se almeja a determinação elementar por técnicas analíticas suscetíveis a interferências ácidas (NOGUEIRA *et al.*, 2010; BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014).

Apesar de terem sido inicialmente propostos para procedimentos de extração, os ácidos diluídos tem sido também aplicados em decomposições por via úmida ou seca (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Particularmente no caso de sistemas de decomposição assistidos por radiação micro-ondas, a utilização de ácidos diluídos é interessante em função do alto poder calorífico da água que, quando adicionada ao sistema, facilita o aquecimento. Ainda, em sistemas fechados, esse aquecimento provoca o aumento da pressão interna do frasco pela geração de gases, e a consequente elevação do ponto de ebulição da mistura de decomposição e de seu poder oxidante (NOGUEIRA *et al.*, 2010; BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014).

Outros processos químicos envolvidos também devem ser considerados para o entendimento da eficiência das decomposições quando ácidos diluídos são utilizados, sendo que a explicação mais aceita para este comportamento está baseada em uma série de reações que acontecem no interior do frasco reacional, resultando na regeneração do HNO_3 . Durante a oxidação dos compostos orgânicos da amostra por ação do HNO_3 ocorre a formação de NO gasoso. Esse, reage com o O_2 presente na fase gasosa do frasco de reação, formando NO_2 . Posteriormente, o NO_2 gerado é reabsorvido na solução, com formação de NO_3^- e NO . O ciclo de reações se repete até que não haja a presença de O_2 na fase gasosa do sistema, como demonstrado nas reações a seguir (NOGUEIRA *et al.*, 2010; BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014).



Dessa forma, pode-se afirmar que, além do uso de sistemas assistidos por radiação micro-ondas potencializarem a ação oxidante de alguns reagentes, pela utilização de elevadas temperaturas e pressões, o que permite inclusive a utilização de ácidos diluídos como solução digestora, o sucesso do procedimento, sem perda da eficiência de decomposição é dependente de dois fatores: (1) a presença de oxigênio na fase gasosa dentro do frasco de decomposição, e (2) o gradiente de temperatura entre as fases líquida e gasosa ao longo do frasco de decomposição. O primeiro deles é responsável pela reação de oxidação do $\text{NO}_{(\text{g})}$ originado na decomposição da matéria orgânica, e o segundo contribui para o aumento de pressão, pois está associado com a absorção de espécies oxidadas na fase gasosa (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014).

A partir disso, a utilização de reagentes diluídos está associada a fatores dependentes de tecnologias mais recentes, como sistemas que permitem a utilização de maiores temperaturas e pressões, e frascos com volume interno suficiente para disponibilizar uma grande quantidade de O_2 a ser utilizada no

mecanismo de regeneração do HNO_3 , e que apresentem um intenso gradiente de temperatura durante a etapa inicial de decomposição, promovendo a condensação dos produtos gasosos oriundos do processo de regeneração. Ainda, partindo do conhecimento de que o aumento da quantidade de O_2 disponível na fase gasosa favorece a regeneração do ácido, o que pode melhorar a eficiência da decomposição das amostras com HNO_3 , o uso de reagentes que atuem como fonte de O_2 no meio reacional, como o H_2O_2 , bem como a utilização de sistemas que permitam a pressurização dos frascos com O_2 , são importantes alternativas a serem consideradas nos estudos com reagentes diluídos (BIZZI *et al.*, 2014 (a); BIZZI *et al.*, 2014 (b); BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014).

É importante ressaltar que amostras com elevado teor de gordura ou com matriz complexa constituem ainda um desafio quanto a aplicação de ácidos diluídos no preparo de amostra, tendo em vista que nestes casos, são geralmente necessárias condições drásticas de reação, as quais têm sido obtidas pelo uso de reagentes concentrados (GONZALEZ *et al.*, 2009). Especialmente no caso de amostras de chocolate, existe na literatura um único relato do uso HNO_3 diluído no preparo da amostra por decomposição assistida por radiação micro-ondas, previamente a determinações elementares por ICP OES e ICP-MS (VILLA *et al.*, 2015). Entretanto, nesse caso, os autores adicionam H_2O_2 à mistura, como reagente oxidante auxiliar. Cabe ressaltar que neste mesmo trabalho, os autores propõem também uma extração dos analitos a partir das amostras de chocolate, mediante aquecimento, utilizando solução de HNO_3 diluído. Entretanto, como não há a decomposição da matéria orgânica, faz-se necessária a introdução de uma etapa de filtração dos digeridos previamente à determinação dos analitos por técnicas espectrométricas que utilizam ICP (VILLA *et al.*, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, são também relatados os métodos empregados para o preparo de amostras e determinação de elementos potencialmente tóxicos em margarinas e chocolates.

É importante destacar que em um momento inicial as amostras foram submetidas a determinações com vistas à sua caracterização. Posteriormente, visando a determinação dos analitos por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), foram avaliados diferentes métodos para o preparo de amostras de margarina, como a decomposição ácida convencional, decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD), decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e radiação ultravioleta (MW-UV), e decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (SRC). Nos procedimentos de preparo de amostras empregando a radiação micro-ondas foram avaliadas diferentes concentrações de solução ácida, com o intuito de selecionar a menor concentração necessária para decompor a amostra de maneira eficiente. A partir dos resultados obtidos para as amostras de margarina, foi selecionado o melhor método de preparo de amostras, o qual foi otimizado para a sua aplicação nas amostras de chocolate.

Em sua maioria, as atividades descritas foram realizadas na Universidade Federal de Pelotas, nas dependências do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais (LCCBio). Entretanto, devido a indisponibilidade de alguns equipamentos na UFPel, parte das atividades foi realizada no Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais (LAQIA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com o apoio do grupo coordenado pelo Prof. Dr. Érico M. M. Flores.

3.1 Instrumentação

Um forno com aquecimento por radiação micro-ondas do tipo cavidade (Multiwave 3000[®], Anton Paar) foi utilizado para os estudos de preparo das amostras por decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas associada ou não à radiação ultravioleta (Fig. 6a). Um sistema equipado com oito frascos de quartzo, com volume interno de 80 ml foi utilizado nesses procedimentos, sendo que para a decomposição associando as radiações micro-ondas e ultravioleta, foi utilizada uma lâmpada de emissão de radiação ultravioleta (Fig. 6c) inserida dentro do frasco de decomposição, conforme proposto por Florian e Knapp (2001). As condições máximas de temperatura, pressão e potência de operação utilizadas nos procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas foram, respectivamente, 280 °C, 80 bar e 900 W, sendo estes com ou sem o uso de radiação ultravioleta.

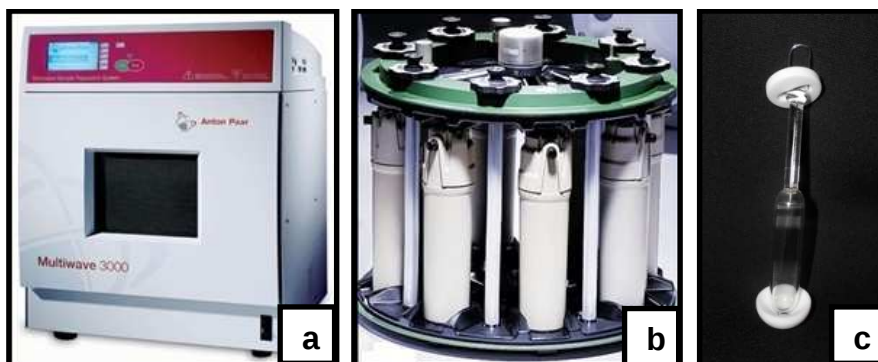


Figura 6 - Forno de micro-ondas comercial Multiwave 3000[®] (Anton Paar) (a); rotor equipado com 8 frascos de quartzo (b); e lâmpada de emissão de radiação ultravioleta em quartzo, com acessórios (anel e base) em PTFE (c).

As decomposições ácidas com aquecimento convencional foram feitas com auxílio de um bloco digestor com controlador de temperatura (modelo MA 4025, Marconi) (Fig. 7). Este equipamento foi equipado com 40 frascos de vidro com diâmetro de 22 mm, profundidade de 25 cm e capacidade aproximada de 80 ml cada.

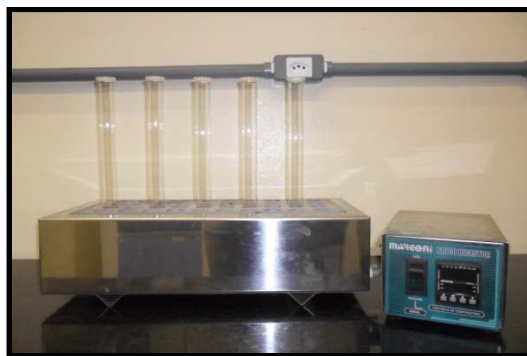


Figura 7 - Bloco digestor MA 4025 (Marconi), equipado com frascos de vidro.

Para a decomposição das amostras no sistema SRC, foi utilizado um forno de micro-ondas com câmara única de reação (UltraWave[®], Milestone) (Fig. 8a). O equipamento foi equipado com um rotor com capacidade para 5 frascos de quartzo, com volume interno de 40 ml cada (Fig. 8b). A pressão, temperatura e potência máximas recomendadas pelo fabricante deste sistema são de 199 bar, 300 °C e 1500 W, respectivamente.

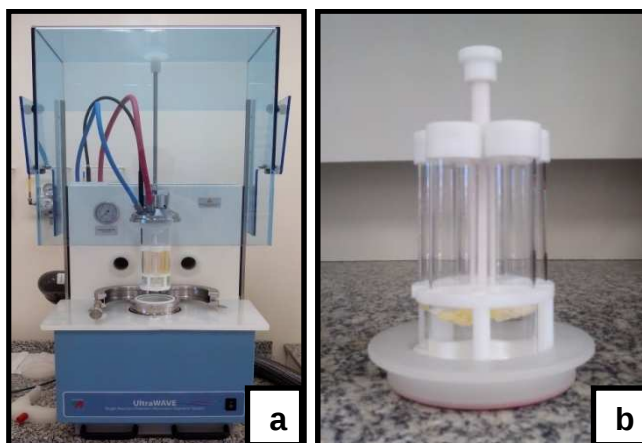


Figura 8 – Sistema SRC comercial UltraWave[®] (Milestone) (a); e suporte equipado com 5 frascos de quartzo (b).

Um banho-maria (modelo 18 BU, Thermomix[®], B. Braun Biotech International) foi utilizado para a homogeneização de amostras de margarina pertencentes a um mesmo lote, mas adquiridas em embalagens separadas. Uma estufa convencional (modelo 400/2ND, DeLeo), uma bomba de vácuo (EXIPUMP), uma manta de aquecimento (modelo 52, Fisatom) e um forno mufla (MAGNUS) foram utilizados nos

procedimentos de determinação dos teores de umidade, gordura e cinzas das amostras.

Os procedimentos de aquecimento de soluções e descontaminação das lâmpadas emissoras de radiação ultravioleta foram realizados com o auxílio de uma chapa de aquecimento (modelo RH basic 2, IKA). Todos os procedimentos de pesagem efetuados durante este trabalho foram feitos em balança analítica (modelo AY220, Shimadzu), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Uma capela de fluxo laminar classe 100 (modelo CSLH-12, Veco) foi utilizada para a secagem de materiais diversos, após procedimentos de descontaminação.

Os teores de carbono nas amostras sólidas, previamente a decomposição foram determinados em um analisador elementar (Truspec, LECO). Por sua vez, os teores de carbono nos digeridos foram determinados por ICP OES (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments). O equipamento foi utilizado na configuração axial e com sistema ótico selado, sendo equipado com câmara de nebulização de vidro de duplo passo e nebulizador do tipo *cross-flow*.

Os analitos foram determinados por ICP-MS (Elan DRC II, PerkinElmer SCIEX). Este espectrômetro foi equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates tipo C), uma câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion, Inc.) e uma tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc.) com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.). A otimização dos parâmetros instrumentais utilizados para as determinações, incluindo vazão do gás de nebulização, voltagem da lente iônica e alinhamento da tocha, foi feita de acordo com as recomendações do fabricante (PerkinElmer-SCIEX, 2003).

3.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Ácido nítrico bidestilado (Merck) foi utilizado para o preparo das soluções digestoras com concentrações variadas avaliadas nos sistemas de decomposição em SRC, decomposição assistida por radiação micro-ondas com e sem uso de radiação ultravioleta (MW-UV e MW-AD, respectivamente), e no sistema de decomposição

com aquecimento convencional. Neste último sistema de decomposição foram utilizados também ácido sulfúrico (Merck) e peróxido de hidrogênio (Merck).

As soluções de calibração para o ICP-MS foram preparadas a partir da dissolução em série de soluções de referência multielementares contendo os analitos (SPEX Certiprep) em ácido nítrico 5% (v v⁻¹). Para as determinações de carbono foram preparadas curvas de calibração em ácido nítrico 5% (v v⁻¹), a partir da diluição de uma solução estoque preparada pela dissolução de ácido cítrico (Merck). As soluções de calibração de carbono foram acrescidas de ítrio (Merck) como padrão interno.

Nas determinações por ICP-MS, o plasma foi gerado a partir de argônio de alta pureza (99,998%, White Martins). O mesmo gás foi utilizado no procedimento de expulsão do CO₂ presente nas amostras decompostas, previamente à determinação do teor de carbono por ICP OES.

A solução de AgNO₃ utilizada nos procedimentos de determinação dos teores de gordura das amostras foi preparada a partir da dissolução do respectivo sal (Merck) em água ultrapura. Esses procedimentos envolveram também a utilização de solução de HCl preparada a partir da diluição do reagente (Merck), e éter de petróleo (Merck).

A solução de KOH utilizada no procedimento de determinação da acidez dos digeridos foi preparada pela dissolução do respectivo sal (Merck) em água, e padronizada com o padrão primário biftalato de potássio (Merck). A solução indicadora de fenolftaleína 1% (m v⁻¹), utilizada nesta determinação, foi preparada pela dissolução do respectivo reagente (Merck) em álcool etílico (Synth).

Ácido nítrico (Merck), na forma concentrada ou em solução aquosa 10% (v v⁻¹), foi utilizado para a descontaminação dos materiais de laboratório utilizados neste trabalho. A água de alta pureza utilizada nos procedimentos foi destilada, deionizada em coluna de troca iônica e, adicionalmente, purificada em um sistema MegaUP[®] (Megapurity), com resistividade final de 18,2 MΩ cm.

3.3 Materiais diversos

A vidraria utilizada e outros materiais comuns de laboratório foram descontaminados por imersão em ácido nítrico 10% ($v\ v^{-1}$) por, pelo menos, 24 horas e, posteriormente, lavados com água ultrapura. Os frascos de vidro utilizados na decomposição ácida com aquecimento convencional foram descontaminados com ácido nítrico concentrado, sob aquecimento convencional à temperatura de 90 °C por 30 min.

Os frascos de quartzo do forno de micro-ondas (Multiwave[®]) e os acessórios em PTFE das lâmpadas de emissão de radiação UV foram descontaminados com ácido nítrico concentrado e aquecimento no forno de micro-ondas usando o seguinte programa de irradiação: i) 1400 W por 10 min; e ii) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Posteriormente, os materiais foram lavados com água ultrapura. As lâmpadas de emissão de radiação ultravioleta foram descontaminadas por imersão em HNO₃ concentrado sob temperatura de ebulição, por 30 min, seguida de lavagem com água ultrapura.

A descontaminação dos frascos de quartzo do sistema SRC também foi conduzida utilizando ácido nítrico concentrado, sob aquecimento no próprio sistema pressurizado com 30 bar de Ar, de acordo com o programa a seguir: i) rampa de 10 min até 250 °C; e ii) 15 min a 250 °C (pressão e potência máximas limitadas em 160 bar e 1500 W, respectivamente). A seguir, os frascos foram lavados com água ultrapura.

3.4 Amostras

Neste trabalho, foram utilizadas 6 amostras de margarina, incluindo produtos com e sem sal, destinadas à alimentação humana e obtidas no comércio local. Os procedimentos de otimização dos métodos foram realizados utilizando uma amostra de margarina sem sal, escolhida aleatoriamente, e adquirida em duas embalagens de aproximadamente 1 kg cada, pertencentes ao mesmo lote de fabricação.

Inicialmente, o conteúdo das duas embalagens foi homogeneizado em banho-maria, em temperatura aproximada de 50 °C sob agitação frequente, segundo

adaptação do método 938.05 recomendado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2011). A agitação foi mantida durante o resfriamento, até que se obtivesse novamente a consistência inicial, quando a amostra foi, então, armazenada à -4 °C até o momento da análise. Previamente aos procedimentos de preparo das amostras, as mesmas foram retiradas da condição de resfriamento e mantidas à temperatura ambiente. Após a homogeneização, uma parte da amostra foi separada a fim de que se realizassem os ensaios de caracterização desta.

As amostras de chocolate utilizadas neste trabalho totalizaram 4 chocolates do tipo ao leite, 3 chocolates do tipo branco, e 12 chocolates à base de cacau, ou com informação à respeito da concentração deste constituinte (quantidades de cacau variando entre 28 e 85%). Além disso, foram utilizadas também 4 amostras de cacau em pó. Todas as amostras foram adquiridas no comércio local.

Inicialmente, foram caracterizadas físico-quimicamente: uma amostra de chocolate ao leite, uma amostra de chocolate branco, e quatro amostras de chocolates com concentrações crescentes de cacau (28%, 40%, 70% e 85%). Estas amostras foram selecionadas aleatoriamente, da mesma forma que foi escolhida uma amostra de chocolate ao leite para os procedimentos de otimização do método de decomposição.

Para a avaliação da exatidão dos métodos foi utilizado o CRM BCR 414 (*Plankton*). Esse CRM foi escolhido para uso no trabalho, considerando a não existência de um material com matriz semelhante à margarina ou chocolate que contivesse concentrações certificadas dos analitos investigados nestas amostras. Assim, a escolha pelo CRM BCR 414 foi motivada pela presença dos analitos com concentrações certificadas neste material, bem como pela sua disponibilidade no laboratório. Visando sanar as inconveniências inerentes ao uso de um CRM com matriz diferente da amostra para a avaliação da exatidão dos métodos, este material foi também decomposto misturado às amostras na forma de ensaios de recuperação dos analitos.

3.5 Caracterização das amostras

3.5.1 Determinação do teor de umidade ou substâncias voláteis

O teor de umidade da amostra de margarina foi determinado, de acordo com o método 920.116, recomendado pela AOAC (2011). Cerca de 5 g de amostra foram submetidos à temperatura de 105 °C, em estufa, até peso constante. O procedimento foi realizado em triplicata, sendo que a diferença entre a massa de amostra inicial e a massa de amostra seca representa o teor de umidade ou substâncias voláteis presentes na margarina. A massa de amostra seca, obtida no procedimento de determinação do teor de umidade ou substâncias voláteis foi armazenada para determinações posteriores.

Para a determinação do teor de umidade nas amostras de chocolate foi utilizado o método 931.04, também recomendado pela AOAC (2011). Neste procedimento, 2 g de amostra foram submetidos à temperatura de 100 °C, em estufa, até peso constante, sendo a diferença gravimétrica entre a massa inicial e a massa seca, correspondente à massa de umidade ou substâncias voláteis. Esse procedimento também foi realizado em triplicata.

3.5.2 Determinação do teor de gordura

A determinação do teor de gordura da amostra de margarina foi realizada de acordo com o método 938.06, recomendado pela AOAC (2011). Nesse procedimento, a massa de amostra seca proveniente da determinação do teor de umidade ou substâncias voláteis, realizada anteriormente, foi macerada com éter de petróleo, filtrada, e lavada repetidamente com o mesmo solvente. A massa de resíduo retido no filtro, após seca, representa as impurezas insolúveis em éter.

Posteriormente, por meio de uma equação matemática, onde a partir de um percentual de 100% são subtraídos os teores já calculados de umidade e impurezas insolúveis em éter, foi possível obter, de forma indireta, o teor de gordura da amostra. O resíduo seco, obtido neste procedimento, realizado em triplicata, foi armazenado para determinação posterior.

Para a determinação do teor de gordura em chocolates, foi aplicado o método 963.15, recomendado pela AOAC (2011). Nesse método, uma massa entre 9 e 10 g de chocolate, adicionada de 45 ml de água fervente e 55 ml de solução de HCl na concentração de 8 mol l^{-1} foi levada à ebulição por 15 minutos, na presença de pérolas de vidro. Em seguida a mistura foi filtrada, sendo o resíduo retido no filtro lavado com água para a remoção do total do Cl, o que foi confirmado pela ausência de precipitação de AgCl na água de lavagem quando adicionada de solução de AgNO_3 . Posteriormente, o papel filtro com o resíduo foi seco em estufa por 6 – 18 h, e levado à extração da gordura pelo método de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente. Após cerca de 4 h de extração, o balão contendo a gordura foi seco em estufa, tendo sua massa final comparada à massa seca do balão ao início do procedimento. A diferença gravimétrica, obtida no procedimento realizado em triplicata, foi equivalente à massa de gordura extraída.

3.5.3 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas da amostra de margarina foi determinado de acordo com o método 920.117, recomendado pela AOAC (2011). Nesse procedimento, os resíduos provenientes da determinação indireta do teor de gordura, foram calcinados em forno mufla a 550°C , até a obtenção de resíduo correspondente à matéria mineral, com peso constante. O procedimento foi realizado em triplicata.

Para a determinação do teor de cinzas em chocolates, foi utilizado o método 972.15, também recomendado pela AOAC (2011). Nesse procedimento, realizado em triplicata, massas de 2 – 5 g de amostra foram levadas ao forno mufla, com aumento vagaroso de temperatura até 600°C , sendo mantidas nesta temperatura por 2 horas.

3.5.4 Determinação do teor de carbono nas amostras

Previamente aos procedimentos de decomposição, uma amostra de margarina sem sal e uma amostra de chocolate ao leite, aleatoriamente selecionadas para os procedimentos de otimização dos métodos, tiveram seus

teores de carbono determinados por meio de análise elementar. Esta determinação foi realizada com o intuito de se obter um valor de carbono inicial para as amostras, a ser comparado com o carbono restante ao final dos procedimentos de decomposição, estimando-se assim o RCC de cada condição e, conseqüentemente, a eficiência do método.

Nesse procedimento, massas de 0,5 g a 1,5 g de amostra são inicialmente introduzidas no sistema de análise elementar através de um amostrador. Após o processo de purga, com vistas à retirada do ar atmosférico, a amostra deixa o amostrador, sendo levada a um forno com temperatura de 900 °C, em presença de oxigênio, para que ocorra a combustão. Os produtos da combustão passam para um forno secundário, denominado *Afterburner*, a uma temperatura de 850 °C para a oxidação adicional e remoção de partículas. Os gases da combustão são coletados em um recipiente denominado *ballast*, sendo posteriormente transferidos para a fase de análise. Nessa fase, o carbono é medido como CO₂ em um detector de infravermelho. O resultado final da análise é exibido como porcentagem em peso ou em partes por milhão, conforme determinado pelo operador. Cabe ressaltar que este mesmo equipamento, permite também a determinação dos teores de H e N.

3.6 Preparo de amostras por decomposição ácida com aquecimento convencional

Foram avaliados dois procedimentos de preparo de amostra de margarina por decomposição convencional, realizados mediante aquecimento em bloco digestor. Estes procedimentos foram adaptados de método descrito na literatura para amostras de óleos e gorduras, no qual a determinação de metais em nível de traço foi realizada por AAS (ANWAR *et al.*, 2004).

3.6.1 Decomposição com ácido nítrico sob aquecimento convencional

Neste procedimento, foram pesadas massas de 1 g de amostra, as quais foram transferidas para frascos de vidro com capacidade aproximada de 80 ml, juntamente com 7 ml de HNO₃ bidestilado. O conjunto foi mantido em repouso à

temperatura ambiente por 2 h e, posteriormente, levado ao bloco digestor onde foi programada a temperatura de 90 °C por 3,5 h, seguida de 150 °C por 4 h.

Após este período, os tubos resfriados, sofreram a adição de 2 ml de HNO_3 , sendo levados novamente ao bloco digestor, onde permaneceram por 2 h na temperatura de 150 °C. O procedimento, realizado em triplicata, teve seus digeridos e brancos avolumados com água ultrapura e armazenados em frascos de polipropileno para posterior determinação dos analitos, por ICP-MS.

3.6.2 Decomposição com ácido nítrico em presença de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio sob aquecimento convencional

Assim como no procedimento de decomposição com aquecimento convencional descrito no item anterior, neste procedimento foram pesadas massas de 1 g de amostra, as quais foram transferidas para frascos de vidro com capacidade aproximada de 80 ml, juntamente com 7 ml de HNO_3 bidestilado. O conjunto foi mantido em repouso à temperatura ambiente por 2 h e, posteriormente, levado ao bloco digestor onde foi programada a temperatura de 90 °C por 3,5 h, seguida de 150 °C por 4 h.

Após este período, os tubos resfriados, foram adicionados cuidadosamente de 2 ml de H_2SO_4 e 1 ml de H_2O_2 , sendo levados novamente ao bloco digestor, onde permaneceram por 2 h na temperatura de 150 °C. O procedimento, realizado em triplicata, teve seus digeridos e brancos avolumados com água ultrapura e armazenados em frascos de polipropileno para posterior determinação dos analitos, por ICP-MS.

3.7 Preparo de amostras por decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas

Nesse trabalho foram avaliados três diferentes métodos de preparo de amostras baseados em decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas. Em um deles, a decomposição da amostra foi realizada no modo assistido unicamente por radiação micro-ondas (MW-AD); no segundo método a decomposição da

amostra foi assistida por uma combinação das radiações micro-ondas e ultravioleta (MW-UV); e no terceiro método, a amostra foi decomposta em um sistema SRC assistido por radiação micro-ondas e sob elevadas temperaturas e pressões.

3.7.1 Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

Neste procedimento, foram transferidas massas de 0,5 g de amostra de margarina para frascos de quartzo com capacidade de 80 ml, junto a 8 ml de solução ácida (HNO_3 em concentrações crescentes de 2 a $14,4 \text{ mol l}^{-1}$). A seguir, os frascos foram fechados e submetidos ao seguinte programa de irradiação com micro-ondas, denominado “programa de irradiação A”: i) rampa de 20 min até atingir a potência de 550 W (FAN 1)¹; ii) 550 W por 10 min (FAN 1); iii) rampa de 10 min até atingir a potência de 900 W (FAN 1); iv) 900 W por 20 min (FAN 1); v) 0 W por 15 min (etapa de resfriamento, FAN 3). A temperatura máxima de decomposição foi limitada em 280°C , e empregou-se uma taxa de aumento de pressão da ordem de $0,5 \text{ bar s}^{-1}$. Este programa foi adaptado a partir de indicações do fabricante do forno micro-ondas, para a decomposição de gorduras em geral (Anton Paar, 2003). Adicionalmente, foi avaliada a possibilidade de decomposição de massas mais elevadas de margarina utilizando este método. Após o término do programa, os digeridos obtidos em triplicata e os brancos foram avolumados com água ultrapura e armazenados em frascos de polipropileno, para posterior determinação de metais por ICP-MS. A possibilidade de decomposição por MW-AD de 1 g de margarina utilizando a maior concentração ácida (HNO_3 $14,4 \text{ mol l}^{-1}$) também foi avaliada, para fins comparativos.

Esse mesmo procedimento foi aplicado para a decomposição do CRM BCR 414, o qual foi submetido à melhor condição de decomposição selecionada dentre as condições avaliadas, a fim de comprovar a exatidão do método proposto. Ainda, como forma de avaliar possíveis interferências da presença da matriz da amostra nas determinações elementares, foi realizada a decomposição de massas de 0,35 g

¹ FAN – Modo de circulação de ar utilizado na cavidade do forno micro-ondas (FAN 1: $63,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$; FAN 2: $126,6 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$; FAN 3: $190 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) (MULTIWAVE 3000, 2006; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014).

de margarina, acrescida de 0,15 g de CRM BCR 414, na forma de um ensaio de recuperação.

Este método de preparo de amostras também foi aplicado para a decomposição de chocolate, como uma comparação ao método MW-UV. Nesse caso, foi avaliada a decomposição de massas de 0,6 g de chocolate ao leite, utilizando 10 ml de HNO_3 na concentração 4 mol l^{-1} , como solução digestora. O programa de irradiação com micro-ondas utilizado para a amostra de chocolate foi o mesmo aplicado para a amostra de margarina (programa de irradiação A).

3.7.2 Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV)

Nesse procedimento de preparo de amostras, que associa o uso das radiações micro-ondas e ultravioleta, foram transferidas massas de 0,5 g de amostra de margarina ou chocolate para frascos de quartzo com capacidade de 80 ml, as quais foram acrescidas de 10 ml de solução ácida (HNO_3 em concentrações crescentes de 2 a $14,4 \text{ mol l}^{-1}$). A seguir, foram introduzidas lâmpadas de emissão de radiação ultravioleta no interior dos frascos, os quais foram fechados e submetidos ao programa de irradiação A, descrito no item anterior. A temperatura máxima de decomposição foi limitada em 280°C , e empregou-se uma taxa de aumento de pressão da ordem de $0,5 \text{ bar s}^{-1}$. Nesse procedimento de decomposição foi utilizado volume de solução ácida mais elevado do que no procedimento de decomposição descrito anteriormente, o que se justifica pela necessidade de cobrir a lâmpada de emissão de radiação ultravioleta presente no interior do frasco, com o intuito de otimizar o aproveitamento das radiações emitidas. Após o término do programa, os digeridos obtidos em triplicata e os brancos foram avolumados com água ultrapura e armazenados em frascos de polipropileno, para posterior determinação dos analitos por ICP-MS.

Assim como no procedimento descrito no item anterior, a avaliação da exatidão de condições de decomposição selecionadas foi também conduzida através da decomposição somente do CRM BCR 414, ou de uma mistura deste material com a amostra. Além disso, foi também avaliada a possibilidade de

decomposição de massas mais elevadas de amostra de margarina e chocolate utilizando este sistema.

Considerando-se relatos da literatura, os quais mencionam que a decomposição por MW-UV pode ser otimizada pela utilização de uma maior circulação de ar no interior da cavidade durante a irradiação com micro-ondas (PEREIRA *et al.*, 2013; PEREIRA; WILTSHE; KNAPP, 20), foi avaliada a substituição do modo de circulação de ar FAN 1 ($63,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) pelo modo FAN 2 ($126,6 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) nas etapas *i* e *ii* do programa utilizado (programa de irradiação A). Ainda, outros programas de irradiação com micro-ondas foram avaliados, visando verificar a possibilidade de promover a decomposição das amostras de maneira eficiente, utilizando menor tempo. Nesses programas, a potência máxima foi programada em 550 W, considerando que esta foi a máxima potência atingida no programa avaliado inicialmente (programa de irradiação A), embora 900 W tenha sido programado como potência máxima de irradiação naquele programa, o que será melhor descrito no próximo capítulo (*Resultados e Discussão*). Assim, foram avaliados programas de irradiação totalizando 55 minutos (programa de irradiação B): *i*) rampa de 20 min até atingir a potência de 550 W (FAN 1); *ii*) 550 W por 20 min (FAN 1); *iii*) 0 W por 15 min (etapa de resfriamento, FAN 3); e 45 minutos (programa de irradiação C): *i*) rampa de 20 min até atingir a potência de 550 W (FAN 1); *ii*) 550 W por 10 min (FAN 1); *iii*) 0 W por 15 min (etapa de resfriamento, FAN 3).

3.7.3 Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (SRC)

O método de decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema SRC foi aplicado para amostras de margarina. Inicialmente, foram avaliadas no sistema massas de 0,5 g de amostra, na presença de 10 ml solução ácida (HNO_3 em concentrações crescentes de 2,0 a $14,4 \text{ mol l}^{-1}$). Os frascos contendo amostra e solução ácida foram cobertos com a tampa, fixados no rotor e levados para a decomposição na câmara única de reação. Previamente à inserção do suporte com os frascos, o copo reacional em PTFE, interno à câmara, foi preenchido com 2 ml de H_2SO_4 , 5 ml de H_2O_2 e 120 ml de água. Após a alocação do copo na câmara de reação e a inserção do rotor com as amostras, o sistema foi fechado manualmente,

e pressurizado com 30 bar de Ar. O programa de aquecimento utilizado no sistema foi: i) rampa de 10 min até 150 °C; ii) 150 °C por 10 min; iii) rampa de 10 min até 250 °C; iv) 250 °C por 15 min; v) resfriamento até a temperatura atingir 50 °C. A pressão e potência de irradiação máximas programadas no sistema foram de 160 bar e 1500 W, respectivamente. Este programa foi adaptado a partir de relato da literatura (NÓBREGA *et al.*, 2012).

Após o término do programa de aquecimento, o resfriamento foi feito pela circulação de água no sistema. A temperatura mínima para início da despressurização, bem como a taxa de despressurização foram de 50 °C e 1 bar min⁻¹, respectivamente. Os digeridos, obtidos em triplicata, e os brancos foram avolumados com água ultrapura e armazenados em frascos de polipropileno, para posterior determinação dos analitos por ICP-MS.

Assim como descrito nos demais métodos de preparo de amostras assistidos por radiação micro-ondas, neste sistema de decomposição foi também avaliada a possibilidade de decomposição de massas mais elevadas de amostra. A exatidão dos resultados obtidos em condições de decomposição selecionadas foi avaliada através da decomposição somente do CRM BCR 414, ou de uma mistura deste material com a amostra.

3.8 Forma de introdução das amostras nos sistemas de decomposição ácida

As amostras de margarina e chocolate foram introduzidas em temperatura ambiente, em todos os sistemas de decomposição avaliados, seja com aquecimento convencional ou assistido por radiação micro-ondas. Dessa forma, dadas as características de elevado teor de gordura e fácil adesão às superfícies em geral apresentadas pelas margarinas, a fim de que fosse realizada a transferência de pequenas massas de amostra (≤ 1 g), foi necessário o desenvolvimento de um sistema de transferência da massa de amostra a ser decomposta para o tubo de decomposição, sem que houvesse perdas. Dessa forma, a transferência das amostras de margarina para os frascos de decomposição foi realizada usando solução digestora ácida quente, a partir de canaletas, construídas com ponteiros de polipropileno com capacidade para 5 ml, próprias para pipetadores automáticos (Fig. 9).

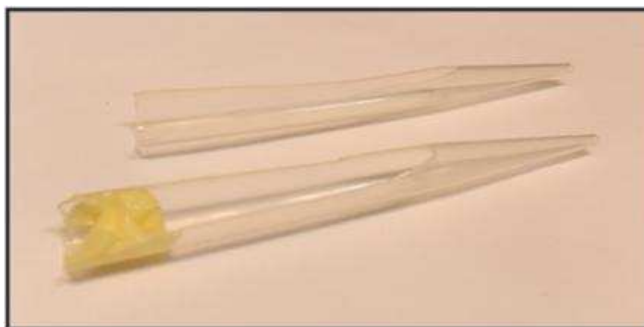


Figura 9 – Canaletas construídas a partir de ponteira de polipropileno, com e sem massa de amostra a ser transferida pra frasco de decomposição.

Para as amostras de chocolate, não foi necessário o uso deste sistema de transferência, tendo em vista que o chocolate não apresenta a mesma propriedade de aderência às superfícies verificada para a margarina. Dessa forma, as amostras de chocolate foram raspadas com o auxílio de uma espátula, pesadas em papel apropriado e transferidas para os frascos de decomposição, sem a necessidade de utilizar solução digestora quente para facilitar o processo.

3.9 Determinação da acidez dos digeridos

A determinação da acidez dos digeridos de chocolate foi conduzida com o intuito de, juntamente aos resultados de RCC, avaliar a eficiência de decomposição dos métodos. Este procedimento foi feito por titulação em meio aquoso com solução de referência de KOH. A titulação foi feita com volumes de amostra entre 100 e 200 µl em um frasco contendo 20 ml de água, sob agitação magnética e em presença de fenolftaleína como indicador ácido-base. O ponto final da titulação foi determinado visualmente.

3.10 Determinação do teor de carbono residual nos digeridos de margarina e chocolate

Além da verificação da acidez dos digeridos, a eficiência dos métodos de decomposição foi também avaliada através da determinação do C por ICP OES e

posterior cálculo dos valores de RCC, baseado no teor de carbono original da amostra, o qual foi quantificado por determinação elementar. Previamente à determinação da concentração de C nos digeridos por ICP OES, as soluções foram purgadas com Ar durante 2 minutos para remover o CO₂ presente, a fim de que este não fosse determinado como C dissolvido. As determinações foram realizadas utilizando-se as condições apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Parâmetros operacionais para a determinação de C por ICP OES.

Parâmetros	ICP OES
Câmara de nebulização	Duplo passo
Potência (W)	1400
Vazão da solução (ml min ⁻¹)	2,10
Vazão principal de argônio (l min ⁻¹)	15,0
Vazão auxiliar de argônio (l min ⁻¹)	1,00
Vazão de argônio do nebulizador (l min ⁻¹)	0,70
Nebulizador	<i>Cross-flow</i>

A curva de calibração foi construída por utilização de soluções preparadas a partir de solução de referência contendo 1000 mg l⁻¹ de C, perfazendo uma curva com concentrações de 10 a 250 mg l⁻¹ de C, tendo Y adicionado como elemento padrão interno, na concentração fixa de 1 mg l⁻¹. As linhas de emissão monitoradas foram 193,094 nm para C, e 371,029 nm para Y.

3.11 Determinação de elementos potencialmente tóxicos nos digeridos de margarina e chocolate por ICP-MS

Depois de submetidos aos diferentes procedimentos de decomposição, os digeridos de margarina e chocolate foram levados ao ICP-MS para a determinação de elementos potencialmente tóxicos. Foram monitorados os isótopos ⁷⁵As, ¹¹¹Cd, ⁵⁹Co, ⁵³Cr, ⁶³Cu, ⁵⁵Mn, ⁹⁸Mo, ⁵⁸Ni, ²⁰⁸Pb, ¹⁰⁶Pd, ¹⁹⁵Pt, ¹⁰³Rh e ⁸⁸Sr selecionados por

apresentarem menor ocorrência de interferências, ou maior abundância natural. As determinações foram feitas utilizando-se as condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais para a determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP-MS.

Parâmetros	ICP-MS
Câmara de nebulização	Ciclônica
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1300
Vazão principal de argônio (l min^{-1})	15,0
Vazão auxiliar de argônio (l min^{-1})	1,20
Vazão de argônio do nebulizador (l min^{-1})	1,10
Nebulizador	Concêntrico
Cones de amostragem (<i>sampler</i> e <i>skimmer</i>)	Pt
Lente iônica	<i>Auto lens on</i>
Tempo de permanência (ms)	40
Número de replicatas	3

A curva de calibração foi construída por utilização de soluções preparadas a partir de soluções de referência contendo os analitos, perfazendo curvas com concentrações de 0,025 a 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ para todos elementos, exceto Pd, Pt e Rh, cuja curva de calibração foi preparada com concentrações entre 0,1 e 5,0 $\mu\text{g l}^{-1}$.

É importante destacar que em um experimento adicional, em que elementos potencialmente tóxicos foram determinados em amostras de cacau em pó, foram realizadas curvas de adição de analito. Estas curvas foram preparadas pela adição de solução de referência às amostras, perfazendo curvas diferenciadas para elementos minoritários (0,5 a 10 $\mu\text{g l}^{-1}$) e majoritários (100 a 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$).

No fluxograma da Figura 10 encontram-se apresentados, de forma resumida, os métodos de preparo de amostra utilizados no presente trabalho, bem como os parâmetros avaliados em cada método, os quais serão discutidos no próximo capítulo (Resultados e Discussão).

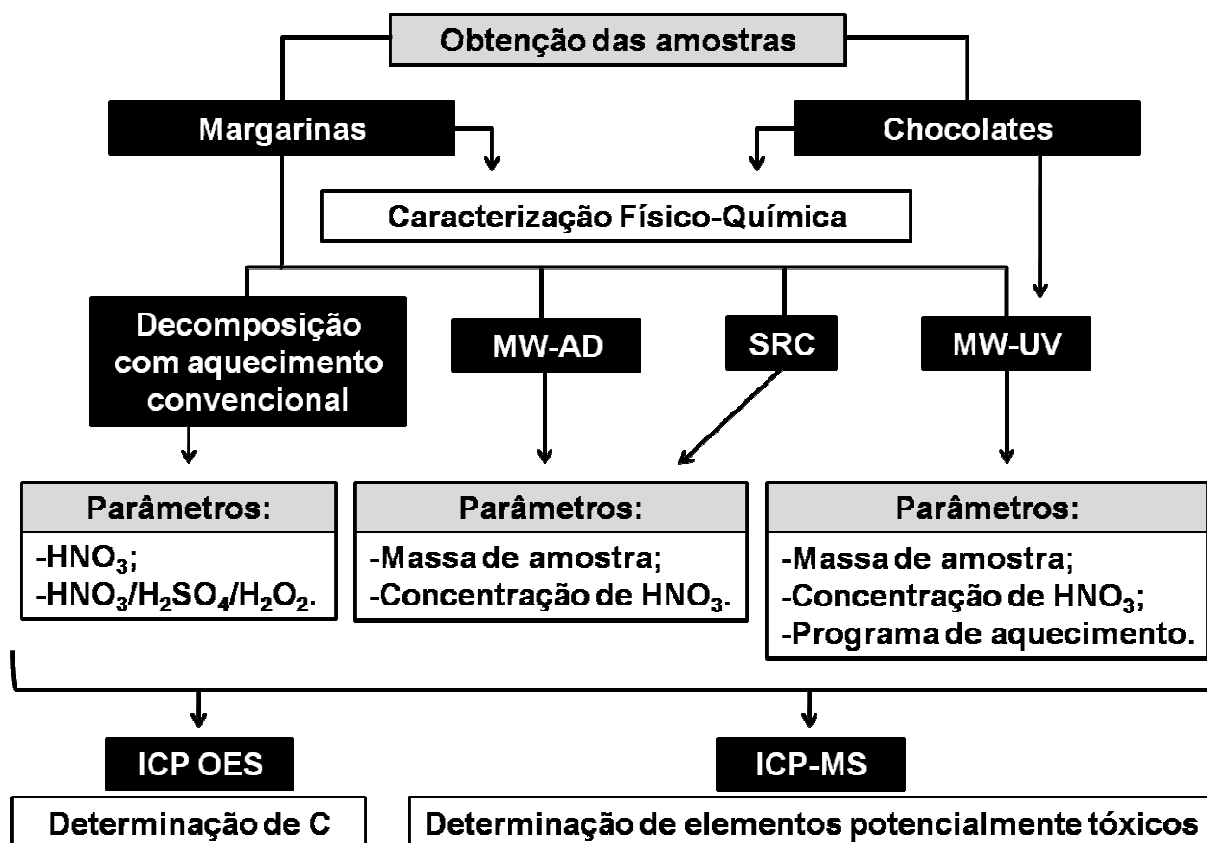


Figura 10 – Fluxograma simplificado dos métodos de preparo de amostras e respectivos parâmetros avaliados neste trabalho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir da realização dos procedimentos descritos no capítulo 3 (Materiais e Métodos). Para uma melhor compreensão, os resultados obtidos a partir dos ensaios de caracterização das amostras, as observações acerca dos métodos de preparo de amostra avaliados para a decomposição de margarinas e chocolates, bem como os resultados referentes à quantificação de elementos potencialmente tóxicos nestas amostras serão discutidos separadamente.

Dessa forma, na primeira parte do capítulo, será realizada a apresentação e discussão a respeito dos resultados obtidos nas investigações feitas utilizando as amostras de margarinas. A seguir, na segunda e última parte, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para as investigações em chocolates.

4.1 Margarina: Avaliação de métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP-MS

Nesta parte inicial, serão descritos os resultados obtidos para todos os ensaios realizados com as amostras de margarina. Cabe ressaltar que os ensaios de caracterização foram conduzidos com uma amostra do produto do tipo sem sal, denominada M1, aleatoriamente selecionada não somente para estas determinações, mas também para os procedimentos de otimização dos métodos de preparo de amostras. As demais amostras de margarina utilizadas no trabalho foram decompostas utilizando o método selecionado e otimizado.

4.1.1 Caracterização da amostra de margarina

As caracterizações realizadas na amostra de margarina M1 se restringiram as determinações dos teores de umidade ou substâncias voláteis, gordura, cinzas e carbono, como descrito no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*). Os resultados obtidos para estes teores encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos para os ensaios de caracterização de amostra de margarina sem sal (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

Parâmetro	Concentração (% m m ⁻¹)
Umidade ou substâncias voláteis	19 $\pm$ 2
Gordura	80 $\pm$ 9
Cinzas	< 1
Carbono	64 $\pm$ 5

Como pode ser observado na Tabela 3 obteve-se um teor de umidade da ordem de 19% para a amostra de margarina avaliada. Este valor é muito próximo do teor de umidade definido pela TACO (2011) para amostras de margarina sem sal (19,6%). Ainda, o resultado é também concordante com os relatos de Zambiasi (2010), quando menciona o teor de umidade para amostras de margarina com valores compreendidos em uma faixa de 15 – 20%. Entretanto, é importante

destacar que teores de umidade da ordem de 30% também são relatados na literatura para algumas margarinas (SHIMIZU, 2009; TACO, 2011).

Um segundo parâmetro avaliado dentro do campo das caracterizações da amostra de margarina, foi o teor de gordura, o qual foi de cerca de 80%, sendo expresso em lipídeos totais. Este valor, encontra-se de acordo tanto com o valor expresso no rótulo do produto (gorduras totais = 80%), referente à rotulagem nutricional obrigatória, quanto com o teor relatado na literatura para amostras de margarina que contêm em sua composição gorduras hidrogenadas (ZAMBIAZI, 2010; TACO, 2011). Além disso, este resultado também está de acordo com o teor recomendado pela Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997 (MAPA - PORTARIA 372, 1997) para gorduras em margarinas (< 95%), e com os valores obtidos no trabalho de Shimizu (2009). Entretanto, é importante destacar que, segundo descrito pela TACO (2011), margarinas que contêm gorduras interesterificadas em sua composição apresentam teores de gorduras totais em torno de 67%, o que sugere que a amostra selecionada para os procedimentos de otimização não tenha este tipo de gordura em sua composição, embora não se tenha esta informação à respeito do produto.

O teor de cinzas determinado na amostra de margarina (< 1%) foi concordante com os valores relatados por Shimizu (2009) para quatro diferentes marcas de margarina comerciais, quando em nenhuma das amostras foi verificado teor de cinzas superior a 1%. Ainda, este valor é semelhante ao descrito pela TACO (2011) para o teor de cinzas em margarinas sem sal. No entanto, cabe ressaltar que o valor determinado para o teor de cinzas pode não representar a totalidade do material inorgânico presente na amostra, visto que é possível a volatilização parcial de alguns minerais durante o aquecimento requerido no procedimento (ZAMBIAZI, 2010).

Quanto à determinação do C elementar, por se tratar de uma amostra com elevado teor de gordura, era esperado um percentual considerável relativo a este elemento. Essa é uma informação importante para a avaliação da eficiência de decomposição dos métodos de preparo de amostra investigados, considerando que é possível comparar o teor de C elementar obtido para a amostra sólida com o teor de C nos digeridos obtidos com cada método utilizado (WURFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989; KRUSHEVSKA *et al.*, 1992).

Cabe também destacar que alguns destes parâmetros investigados, além de ter relação direta com a qualidade do alimento analisado, podem também influenciar na etapa de preparo das amostras, previamente às determinações elementares em margarina. O teor de gordura elevado, por exemplo, caracteriza uma amostra de difícil decomposição, exigindo a utilização e desenvolvimento de métodos adequados para a sua decomposição.

4.1.2 Avaliação dos métodos de preparo de amostras utilizados para a decomposição de margarina

A amostra de margarina sem sal M1, selecionada para os procedimentos de otimização dos métodos propostos neste trabalho, foi submetida à decomposição ácida em sistemas com aquecimento convencional ou assistidos por radiação micro-ondas. Cada um desses métodos teve a sua eficiência de decomposição avaliada a partir do RCC determinado nos digeridos, o qual foi calculado pela diferença entre o carbono elementar quantificado na amostra previamente à decomposição, e o carbono presente nas soluções obtidas após os procedimentos de decomposição.

Assim, os resultados obtidos para a avaliação de cada um dos métodos de preparo de amostras aplicados para a decomposição de margarina serão apresentados a seguir, em tópicos distintos. É importante destacar que os resultados referentes à aplicabilidade do método selecionado para as demais margarinas, bem como os ensaios de avaliação da exatidão conduzidos em cada caso, serão também abordados em tópicos específicos.

4.1.2.1 Decomposição ácida com aquecimento convencional

Os primeiros métodos de decomposição avaliados para massas de 1 g de amostra, envolvendo aquecimento convencional em bloco digestor: i) decomposição com ácido nítrico e, ii) decomposição com ácido nítrico em presença de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, apresentaram concentrações de C nos digeridos da ordem de 10000 e 5000 mg l⁻¹, respectivamente. Considerando o teor de C elementar na amostra previamente a decomposição (aproximadamente 64%), estas

concentrações correspondem a RCCs de 47% para o método de decomposição empregando somente ácido nítrico, e 23% para o método que utiliza a mistura de reagentes. O menor valor de RCC obtido com o procedimento que envolve a adição de outros reagentes além do HNO_3 pode ser explicado pelo fato de os reagentes adicionados, H_2SO_4 e H_2O_2 , serem conhecidos por aumentarem a eficiência dos procedimentos de decomposição em geral, devido as suas respectivas características de aumento do ponto de ebulição do meio digestor, e alto poder oxidante (COSTA *et al.*, 2010).

Entretanto, apesar do menor RCC observado pelo emprego do procedimento de decomposição convencional com HNO_3 em presença de H_2SO_4 e H_2O_2 , em comparação ao procedimento de decomposição convencional somente com HNO_3 , verificou-se uma menor precisão entre seus resultados, visto que o desvio padrão relativo (RSD) obtido nas determinações de C após decomposição convencional somente com HNO_3 foi da ordem de 8%, enquanto que o uso dos outros reagentes, somado ao HNO_3 , forneceu resultados com RSD de 30%. Desta forma, foi possível perceber que, embora o uso dos outros reagentes junto ao HNO_3 tenha promovido uma decomposição mais eficiente, o que é claramente visualizado a partir dos RCCs obtidos para os digeridos de cada um dos métodos, seu uso reduziu a precisão dos resultados, visto que para massas iguais de amostra, obtiveram-se valores para C com variação considerável.

Além disso, embora o uso de H_2SO_4 e H_2O_2 promova maior eficiência de decomposição, sua aplicação em procedimentos que visam a determinação de elementos em nível de traço pode fornecer desvantagens, relacionadas principalmente à ocorrência de contaminações ou interferências. Apesar de H_2O_2 ser um reagente disponível com alto grau de pureza, o mesmo não é observado para a maioria das formas comerciais de H_2SO_4 , de forma que podem ocorrer alterações nos resultados, devidas à contaminação pelo reagente. Além disso, deve ser considerada a possibilidade de ocorrência de interferências não espectrais nas determinações por ICP-MS, considerando a elevada viscosidade da solução em presença de H_2SO_4 , a qual pode interferir no transporte da amostra até o equipamento (COSTA *et al.*, 2010; KRUG, SANTOS JR., 2010; MÜLLER *et al.*, 2014).

4.1.2.2 Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

As decomposições de margarina por MW-AD foram realizadas inicialmente utilizando 0,5 g de amostra, sob aquecimento por micro-ondas segundo o programa de irradiação A, descrito no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*). Neste estudo foram avaliadas diferentes concentrações de HNO_3 como solução digestora, sendo possível a obtenção de um perfil de redução do RCC, de acordo com o aumento da concentração de ácido utilizada, como demonstra a Figura 11.

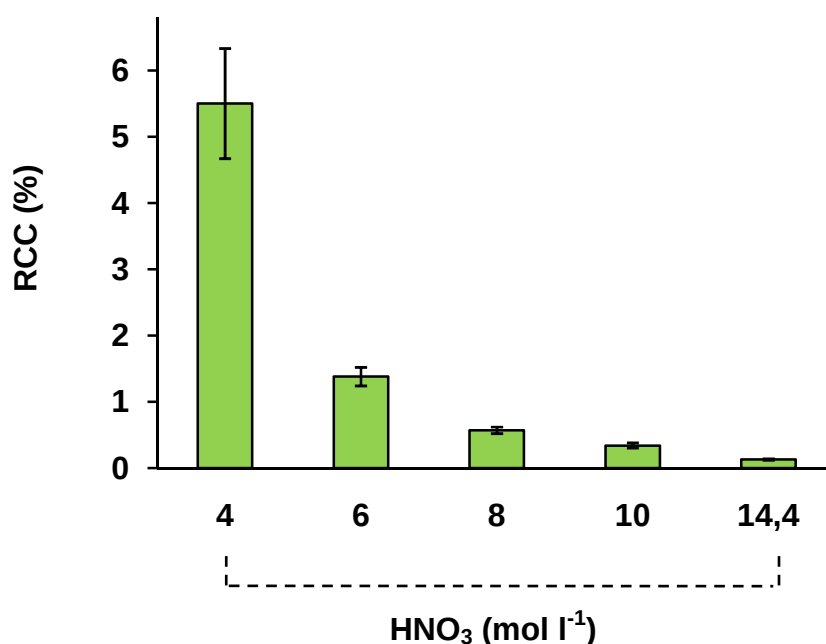


Figura 11 – Teores de carbono residual obtidos nos digeridos de 0,5 g de margarina, após decomposição por MW-AD, utilizando variadas concentrações de ácido nítrico como solução digestora ($n = 3$).

Como pode ser observado, na Fig. 11 são apresentados apenas os RCCs obtidos nos digeridos de margarina por MW-AD utilizando concentrações de HNO_3 iguais ou superiores a 4 mol l^{-1} . Cabe ressaltar que o teor de C nos digeridos por MW-AD com $\text{HNO}_3 2 \text{ mol l}^{-1}$ não foi determinado devido a uma visível decomposição incompleta da amostra, resultando em uma solução com coloração amarelada e presença de materiais insolúveis, como demonstrado na Fig. 12. A introdução de

digeridos com estas características no espectrômetro poderia acarretar em entupimento do sistema de nebulização deste.

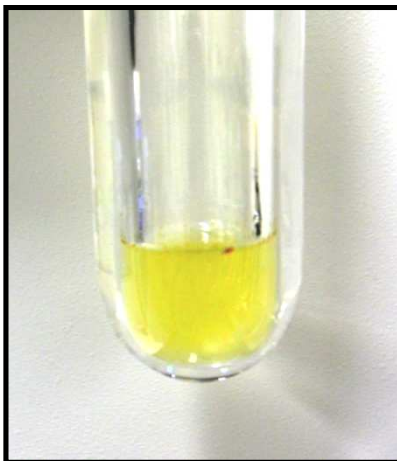


Figura 12 – Aspecto da solução obtida pelo tratamento de 0,5 g de margarina por MW-AD utilizando HNO_3 2 mol l^{-1} como solução digestora.

Ainda com relação aos resultados apresentados na Fig. 11, é possível observar uma grande diferença entre o RCC obtido nos digeridos de margarina por MW-AD empregando as soluções de HNO_3 com concentração de 4 mol l^{-1} (RCC: 5,5%, correspondente a um teor de C de 591 mg l^{-1} em solução) ou 6 mol l^{-1} (RCC: 1,4%, correspondente a um teor de C de 147 mg l^{-1} em solução). Esta diferença vai sendo amenizada com o aumento da concentração ácida, de forma que o uso de HNO_3 com concentração igual ou superior a 8 mol l^{-1} forneceu digeridos com RCCs inferiores a 0,6%, sendo correspondentes a um teor de carbono dissolvido em solução menor ou igual a 60 mg l^{-1} . Além disso, é importante destacar que, além do maior RCC apresentado, a utilização de HNO_3 4 mol l^{-1} no procedimento de MW-AD também demonstrou RSDs mais elevados (da ordem de 15%) se comparados aos RSDs observados com o uso das demais condições ácidas avaliadas (até 10%).

Posteriormente, como forma de avaliar a eficiência da decomposição em sistema fechado assistido por radiação micro-ondas, em comparação ao sistema de decomposição por via úmida com aquecimento convencional avaliado anteriormente, foi conduzido um estudo comparativo, pela decomposição de massa aproximada de 1 g de margarina por MW-AD, utilizando HNO_3 $14,4 \text{ mol l}^{-1}$ (condições utilizadas no procedimento de decomposição com aquecimento convencional). Assim, utilizando

esta condição ácida, foram obtidos teores de carbono em solução da ordem de 620 mg l⁻¹, os quais correspondem a um RCC de 3%. Este residual de carbono obtido por MW-AD é bastante inferior ao apresentado pelo método de decomposição com aquecimento convencional (47%), demonstrando que o uso de sistema de decomposição em frasco fechado e assistido por radiação micro-ondas possibilitou a obtenção de uma maior eficiência de decomposição, estando de acordo com os relatos da literatura (KORN *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2014).

Ainda é importante ressaltar que o residual de carbono (3%) obtido pela decomposição de 1 g de amostra por MW-AD utilizando HNO₃ 14,4 mol l⁻¹, a qual pode ser considerada a condição de decomposição mais drástica dentre as avaliadas, representa em torno de 20 vezes o residual obtido pela decomposição de 0,5 g de amostra, sob as mesmas condições (aproximadamente 0,15%). Dessa forma, esse experimento permitiu observar que o método avaliado (MW-AD com HNO₃ 14,4 mol l⁻¹) apresenta ótima eficiência de decomposição para massas de 0,5 g, não sendo, no entanto, adequado para a massa de 1 g. Cabe ressaltar que massas intermediárias não foram decompostas por MW-AD neste trabalho com o intuito de averiguar os teores de C que apresentariam. Além disso, é importante enfatizar que esta condição é dependente do tipo de amostra decomposta e da técnica de determinação pretendida. Quanto ao uso de soluções diluídas de HNO₃, foram obtidas decomposições satisfatórias (RCC < 1,4%) para a massa de 0,5 g de amostra, utilizando HNO₃ em concentrações iguais ou superiores a 6 mol l⁻¹.

Assim, o uso de HNO₃ na concentração de 6 mol l⁻¹ para a decomposição de 0,5 g de margarina por MW-AD, mostrou-se como a melhor condição dentre as avaliadas. Esta condição foi escolhida por ser a menor concentração ácida em que se obteve RCC inferior a 1,4%, sendo correspondente a um teor de carbono dissolvido em solução da ordem de 147 mg l⁻¹, o qual provavelmente não acarretaria em interferências nas determinações por ICP-MS, permitindo a determinação direta nos digeridos, sem a necessidade de diluição previamente à análise.

4.1.2.3 Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV)

Outro método de preparo de amostras avaliado para a decomposição de margarina foi a MW-UV. Este procedimento foi realizado inicialmente pela decomposição de 0,5 g de margarina, utilizando diferentes concentrações de HNO_3 (2, 4, 6, 8, 10 e 14,4 mol l^{-1}), sob aquecimento assistido por radiação micro-ondas segundo o programa de irradiação A, descrito no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*) e em presença de radiação ultravioleta. Os RCCs observados para os digeridos sob estas condições apresentaram comportamento semelhante ao verificado nas decomposições por MW-AD, considerando que menores valores de C foram obtidos com o uso de maiores concentrações ácidas como solução digestora. Os RCCs obtidos nestes ensaios conduzidos por MW-UV estão apresentados na Fig. 13.

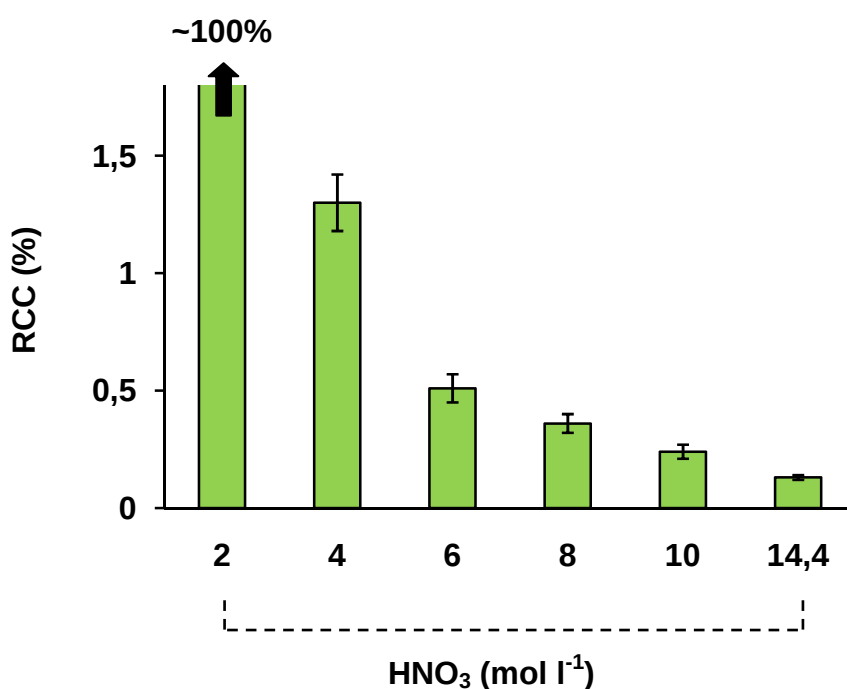


Figura 13 – Teores de carbono residual obtidos nos digeridos de 0,5 g de margarina, após decomposição por MW-UV, utilizando variadas concentrações de ácido nítrico como solução digestora ($n = 3$).

Cabe destacar que utilizando MW-UV foram obtidas soluções com aspecto límpido em todas as concentrações ácidas avaliadas (Fig. 14). Entretanto, quando

utilizou-se HNO_3 na concentração de 2 mol l^{-1} , apesar do aspecto límpido, o RCC determinado nos digeridos ($\sim 100\%$), demonstrou que nesta condição não houve decomposição da matéria orgânica. No entanto, observando os RCCs obtidos com o uso das demais concentrações de HNO_3 , foi possível verificar que utilizando HNO_3 em concentração igual ou superior a 4 mol l^{-1} , foram obtidos RCCs inferiores a 1,4% (condição alcançada por MW-AD somente para digeridos com HNO_3 em concentração igual ou superior a 6 mol l^{-1}). Assim, pode-se verificar que o uso da radiação ultravioleta associada à radiação micro-ondas promoveu decomposição mais eficiente da amostra de margarina, em todas as concentrações de HNO_3 avaliadas, se comparada ao procedimento de decomposição assistido apenas por radiação micro-ondas. Este fato corrobora com relatos da literatura, os quais recomendam a associação destas radiações como forma de aumentar a eficiência de decomposição de amostras com elevado teor de carbono, diminuindo assim os RCCs dos digeridos (FLORIAN; KNAPP, 2001; NOGUEIRA; CAVICCHIOLI; KAMOGAWA, 2010; PEREIRA; WILTSCHKE; KNAPP, 2014; MESKO *et al.*, 2015).

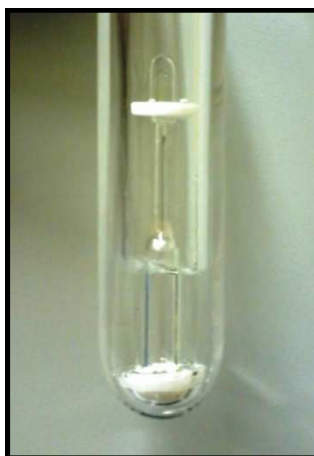


Figura 14 – Aspecto dos digeridos de 0,5 g de margarina por MW-UV, independente da concentração de HNO_3 avaliada como solução digestora.

Outro fato importante observado refere-se aos RSDs obtidos para as medidas de carbono por ICP OES nos digeridos por MW-UV, se comparados aos digeridos obtidos por MW-AD. Enquanto nos digeridos pelo método assistido somente pela radiação micro-ondas foram verificados RSDs de até 15%, as concentrações de C nos digeridos por MW-UV apresentaram o percentual de 8% como valor máximo de

RSD. Este valor de RSD representa uma maior precisão dos resultados referentes à determinação de C, característica de uma decomposição mais homogênea do que a verificada por MW-AD. Assim, considerando os RCCs inferiores a 1,4% obtidos para a decomposição de 0,5 g de margarina por MW-UV utilizando HNO_3 com concentração igual ou superior a 4 mol l^{-1} , esta condição foi selecionada para a continuidade dos experimentos por MW-UV, considerando ser a menor concentração ácida dentre as avaliadas onde foi possível a decomposição eficiente de 0,5 g de margarina.

A partir disto, foram conduzidos estudos visando a decomposição de maiores massas de amostra nesta condição. Avaliou-se, então, a decomposição de massas de 0,6 e 0,7 g de margarina, obtendo-se digeridos com RCCs de 6,4 e 52%, respectivamente. Estes valores, bastante superiores aos obtidos para a decomposição de 0,5 g sob as mesmas condições (1,3%), motivaram a escolha de 0,5 g como a maior massa de margarina a ser eficientemente decomposta por MW-UV.

Posteriormente, foram realizados ensaios com o objetivo de verificar a influência do volume de circulação de ar dentro da cavidade do forno micro-ondas, durante a irradiação das amostras. Desta forma, como sugerido na literatura (PEREIRA *et al.*, 2013; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014), foi avaliado o uso da circulação de ar no modo FAN 2, em substituição ao modo FAN 1, durante a irradiação com micro-ondas. Para esta avaliação, massas de 0,5 g de margarina, foram decompostas por MW-UV utilizando HNO_3 4 mol l^{-1} , como solução digestora. Neste procedimento, cuja única alteração em relação ao anteriormente utilizado, foi o uso de circulação de ar no modo FAN 2, foram obtidos digeridos com RCC de 1,5%, os quais não diferem significativamente dos valores observados quando a decomposição foi realizada mediante o uso de circulação de ar no modo FAN 1. Dessa forma, observou-se que esta alteração no volume de ar no interior da cavidade durante a irradiação das amostras com micro-ondas não promove benefícios para a decomposição de 0,5 g de margarina, como descrito na literatura para outras amostras (PEREIRA *et al.*, 2013; PEREIRA; WILTSCHE; KNAPP, 2014).

Um outro parâmetro investigado foi o tempo de decomposição das amostras. Considerando que o programa de irradiação A, utilizado nos estudos iniciais, totaliza 75 min, incluindo rampas de aquecimento, irradiação com micro-ondas e

resfriamento do sistema, foi avaliada a eficiência de decomposição das amostras utilizando os programas de irradiação B e C, descritos no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*), os quais têm duração total de 55 e 45 min, respectivamente. Cabe ressaltar que a potência máxima de irradiação nesses programas (B e C) foi fixada em 550 W, partindo do que foi observado no primeiro programa avaliado (programa A), no qual apesar de programada a potência máxima de irradiação em 900 W, não foi verificada irradiação em potência superior a 550 W, durante o tempo de decomposição das amostras. Isto ocorreu devido ao alcance da pressão máxima estabelecida (80 bar) nos primeiros minutos de irradiação com 550 W, de forma que a potência de irradiação foi reduzida para cerca de 500 W até o final do programa, como forma de segurança (Fig. 15). É importante destacar que nos programas de irradiação B e C, foi mantida a rampa de aquecimento utilizada no programa de irradiação A, como forma de evitar a ocorrência de reações espontâneas, dado o elevado teor orgânico da amostra. A máxima temperatura alcançada em quaisquer dos 3 programas de irradiação avaliados foi de 200 °C, a qual foi atingida juntamente com o alcance da pressão máxima do sistema.

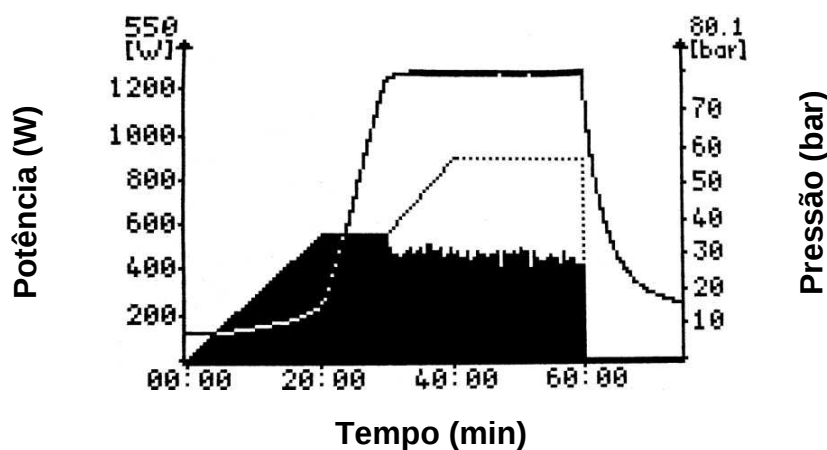


Figura 15 – Representação do perfil gráfico da decomposição de 0,5 g de margarina utilizando o programa de irradiação com micro-ondas denominado como “programa de irradiação A”.

Com relação aos RCCs determinados nos digeridos de 0,5 g de margarina utilizando os programas de irradiação B e C, observou-se perda na eficiência da decomposição de acordo com a redução de tempo aplicada. Para os digeridos

utilizando o programa de irradiação B (55 min de duração) o RCC foi da ordem de 6,9%; enquanto que para o programa de irradiação C (45 min de duração) o RCC determinado foi de 8,6%. Ambos os valores de RCC obtidos nestas condições são superiores ao valor obtido para os digeridos utilizando o programa de irradiação A (duração de 75 min), que foi de 1,3%. Desta forma, dentre os programas de irradiação com micro-ondas avaliados, o programa A foi considerado o mais adequado, considerando-se os reduzidos RCCs obtidos.

Dessa forma, após os procedimentos de otimização do método de decomposição por MW-UV, foram selecionadas como melhores condições o uso de 10 ml de HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} , sob aquecimento segundo o programa de irradiação A. Usando estas condições foi possível a decomposição eficiente de 0,5 g de margarina.

4.1.2.4 Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (SRC)

A amostra de margarina M1, selecionada para os procedimentos de otimização dos métodos foi também submetida ao procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas, sob altas temperaturas e pressões em um sistema de câmara única de reação (SRC), sob aquecimento segundo programa descrito no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*). Nesse procedimento, foram avaliadas diferentes concentrações de HNO_3 (2, 4, 6, 8, 10 e $14,4 \text{ mol l}^{-1}$), bem como a maior massa de amostra possível de ser decomposta no sistema com eficiência (reduzidos RCCs).

Assim, inicialmente foi realizada a decomposição de 0,5 g de margarina, com 10 ml de solução de HNO_3 , sendo os RCCs obtidos nos digeridos de cada condição ácida avaliada apresentados na Fig. 16. Cabe enfatizar que os digeridos de margarina utilizando HNO_3 na concentração de 2 mol l^{-1} não tiveram o RCC determinado, considerando a visível decomposição ineficiente, evidenciada pelo aspecto escuro da solução obtida pelo uso desta concentração ácida. É importante também destacar que em todas as condições avaliadas foram atingidas pressão, potência e temperatura máximas de 70 bar, 1500 W e 250°C , respectivamente.

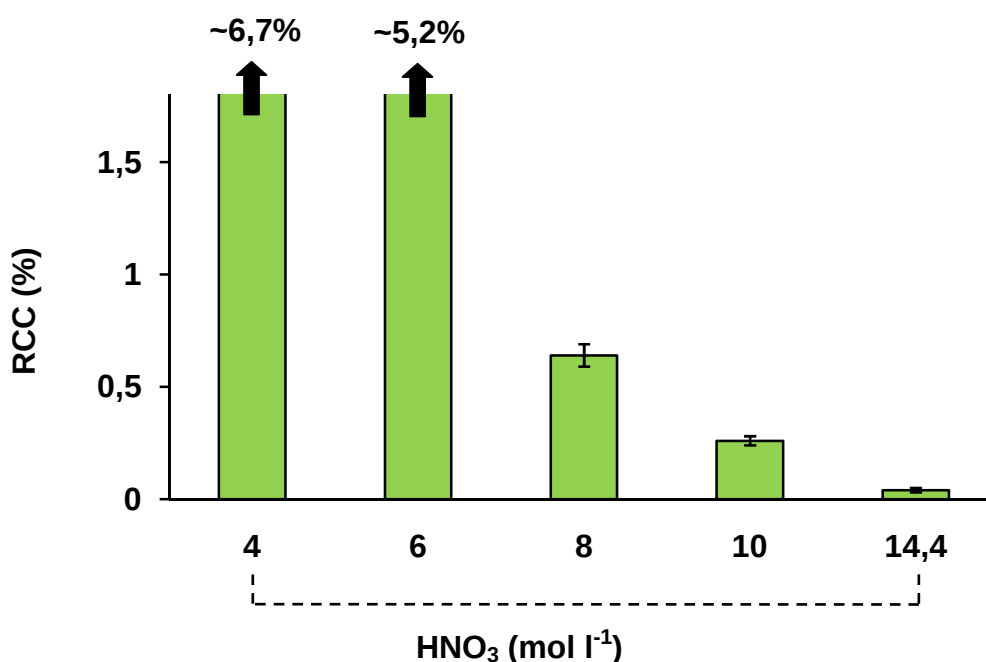


Figura 16 – Teores de carbono residual obtidos nos digeridos de 0,5 g de margarina, após decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema SRC, utilizando variadas concentrações de HNO₃ como solução digestora (n = 3).

Como pode ser observado, utilizando solução de HNO₃ em concentração igual ou superior a 8 mol l⁻¹, foram obtidos RCCs inferiores a 1% (correspondentes a um teor de C dissolvido menor ou igual a 107 mg l⁻¹), compatíveis com uma boa eficiência de decomposição. Por sua vez, o uso de HNO₃ nas concentrações 4 e 6 mol l⁻¹, consideradas satisfatórias para as decomposições de 0,5 g de margarina por MW-UV e MW-AD, respectivamente, apresentaram RCCs > 5% (correspondentes a um teor de C dissolvido de no mínimo 555 mg l⁻¹). Assim, a concentração ácida de 8 mol l⁻¹ foi escolhida para a continuidade dos estudos, tendo em vista que foi a menor concentração de HNO₃ dentre as avaliadas em que foi possível a obtenção de resultados compatíveis com uma decomposição eficiente da matéria orgânica.

A partir disso foram avaliadas as decomposições de massas mais elevadas (até 1 g) de margarina por SRC, utilizando 10 ml de HNO₃ na concentração de 8 mol l⁻¹ como solução digestora. Este estudo foi realizado visando o conhecimento da maior massa de amostra que poderia ser eficientemente decomposta utilizando o

sistema. Assim, quando foram avaliadas as decomposições de massas de 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 g de amostra por SRC obteve-se digeridos com RCCs da ordem de 0,61; 0,63; 0,64; 1,34 e 2,65%, respectivamente. Como pode ser observado, os RCCs obtidos para os digeridos de até 0,8 g de amostra praticamente mantiveram-se inalterados, além de corresponderem a uma eficiente decomposição. Por sua vez, o RCC obtido para a decomposição de 0,9 g (1,34%), apesar de percentualmente corresponder a uma eficiência de decomposição considerada satisfatória para a decomposição de menores massas de amostra, está, neste caso, relacionado a um teor de C dissolvido da ordem de 260 mg l^{-1} , o qual pode acarretar em interferências por ICP-MS. Este fato é coerente com a maior massa de amostra decomposta nesta condição, demonstrando que considerar somente o RCC na avaliação de decomposições de massas diferentes de uma mesma amostra pode ser uma conduta inadequada.

Assim, a massa de 0,8 g de margarina foi considerada como a maior massa possível de ser eficientemente decomposta do sistema SRC, considerando não somente o RCC obtido nesta condição, mas também o teor de C dissolvido nos digeridos (aproximadamente 110 mg l^{-1}). Cabe ressaltar que essa massa é 60% maior do que a massa possível de ser decomposta por MW-UV, sendo, portanto, mais adequada para a determinação de elementos presentes em baixas concentrações, considerando que a decomposição de massas mais elevadas contribui para a redução do LOD. Entretanto, a decomposição desta massa de amostra por SRC está condicionada ao uso de uma solução ácida com o dobro da concentração da solução utilizada por MW-UV (4 mol l^{-1}), o que pode elevar as concentrações elementares nos brancos analíticos e, assim, contribuir negativamente para os valores de LOD.

4.1.3 Brancos analíticos e limites de detecção obtidos com o uso dos variados métodos de decomposição das amostras de margarina

Com o objetivo de realizar determinações elementares em margarinas, a amostra M1, selecionada para os ensaios de otimização dos procedimentos, foi decomposta por diferentes métodos utilizando aquecimento convencional ou assistido por radiação micro-ondas. No grupo das decomposições com aquecimento

convencional foram utilizados dois diferentes métodos, diferenciados apenas pelos reagentes utilizados, enquanto que no grupo das decomposições assistidas por radiação micro-ondas, foram avaliadas diferentes concentrações de ácido como solução digestora, bem como a utilização de uma fonte de radiação ultravioleta, juntamente com a radiação micro-ondas, ou ainda o uso de SRC.

Após a avaliação da eficiência de decomposição dos variados métodos investigados neste trabalho e, consequente otimização da maior massa possível de ser decomposta em cada caso, assim como da menor concentração de solução que poderia ser utilizada, os métodos de decomposição foram avaliados quanto aos valores de LODs, e concentrações elementares nos brancos analíticos. Assim, na Tabela 4 encontram-se apresentadas as concentrações elementares nos brancos analíticos, e os LODs obtidos com o uso das concentrações ácidas otimizadas para os métodos MW-AD, MW-UV e SRC. Para o cálculo dos LODs foram considerados a concentração dos elementos no branco analítico, o volume de aferição dos digeridos, e a massa de amostra utilizada. É importante destacar que tanto os LODs quanto as concentrações elementares nos brancos analíticos obtidos para cada método diferem entre si, provavelmente devido à concentração de solução digestora utilizada e à massa possível de ser eficientemente decomposta em cada método.

Cabe destacar, que os digeridos obtidos com os métodos de decomposição por via úmida com aquecimento convencional não foram avaliados segundo estes parâmetros, considerando a elevada concentração de ácidos e H_2O_2 utilizada nesses procedimentos, e a baixa eficiência de decomposição da matéria orgânica verificada pelo uso desses métodos. É sabido que o uso desses reagentes com elevadas concentrações, tornaria necessária a introdução de uma etapa de diluição previamente as determinações em ICP-MS devido a possibilidade da ocorrência de interferências físicas ou espectrais por uso de ácidos concentrados durante a determinação, além de elevar as concentrações elementares nos brancos analíticos, ocasionando o aumento dos LODs do método e impossibilitando a quantificação de elementos traço nessas amostras (COSTA *et al.*, 2010; KRUG, SANTOS JR., 2010). Além disso, o elevado RCC determinado nestes digeridos também acarretaria na necessidade de diluições previamente as determinações elementares nos digeridos por ICP-MS, devido aos riscos de depósitos de C na interface do instrumento ou interferências nas determinações (SOUZA, 2007), o que também contribuiria para o

aumento dos LODs. Assim, considerando que o trabalho tem como um dos objetivos a decomposição das amostras utilizando reagentes tão diluídos quanto possível, esses métodos baseados em aquecimento convencional foram desconsiderados.

Tabela 4 – Limites de detecção e concentrações elementares médias nos brancos analíticos obtidos utilizando as concentrações de ácido selecionadas para cada método de preparo da amostra avaliado (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

Elemento	LOD (ng g ⁻¹)			Concentração média dos brancos analíticos (µg l ⁻¹)		
	MW-AD ^a	MW-UV ^b	SRC ^c	MW-AD ^a	MW-UV ^b	SRC ^c
As	1,08	1,04	0,788	< 0,01*	< 0,01*	< 0,01*
Cd	1,26	1,18	1,01	0,012	0,010	0,018
Co	1,50	1,30	1,16	0,019	0,015	0,025
Cr	19,9	18,9	15,2	0,194	0,178	0,268
Cu	66,1	59,3	57,2	0,895	0,781	1,320
Mn	21,7	18,9	14,2	0,289	0,243	0,306
Mo	2,14	1,90	1,52	0,026	0,022	0,031
Ni	42,7	35,6	32,4	0,585	0,467	0,739
Pb	10,0	9,42	7,87	0,089	0,078	0,132
Pd	0,301	0,264	0,225	0,005	0,004	0,006
Pt	0,360	0,302	0,263	0,006	0,005	0,007
Rh	0,299	0,283	0,225	0,005	0,005	0,006
Sr	18,7	17,9	14,1	0,291	0,278	0,356

Massa de amostra: ^a0,5 g; ^b0,5 g; ^c0,8 g.

Solução digestora: ^aHNO₃ 6 mol l⁻¹; ^bHNO₃ 4 mol l⁻¹; ^cHNO₃ 8 mol l⁻¹.

*LOD da técnica de determinação para o elemento.

Como pode ser observado, os maiores LODs são obtidos com o uso do método de decomposição da amostra por MW-AD, se comparado aos valores obtidos com os demais métodos avaliados. Este fato provavelmente está relacionado

ao uso de HNO_3 na concentração de 6 mol l^{-1} como solução digestora, o que ocasiona uma pequena elevação no valor na concentração dos brancos, se comparado, por exemplo, ao uso de HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} , como no método MW-UV. Por sua vez, os menores LODs são observados quando é utilizado o sistema SRC, apesar de neste método a decomposição ser efetuada utilizando solução de HNO_3 com o dobro da concentração utilizada por MW-UV. Isto pode ser explicado pela elevada massa de amostra possível de ser decomposta eficientemente no sistema, a qual representa 60% a mais que a massa decomposta pelos demais métodos. Ainda, cabe enfatizar que LODs mais elevados para alguns elementos foram ocasionados pela obtenção de concentrações também superiores nos brancos analíticos.

4.1.4 Avaliação da exatidão

Com o objetivo de avaliar a exatidão dos resultados obtidos pelo uso de cada um dos métodos de decomposição assistida por radiação micro-ondas investigados neste trabalho, foi realizado inicialmente um ensaio de recuperação de analitos. Neste procedimento, a amostra de margarina M1 foi enriquecida com concentrações conhecidas dos analitos (10 a 80 ng g^{-1} , de acordo com as concentrações dos elementos na amostra), através da adição de solução de referência multielementar, previamente à decomposição utilizando cada um dos métodos otimizados. Cabe ressaltar que os referidos métodos são: *i*) MW-AD utilizando HNO_3 na concentração de 6 mol l^{-1} (decomposição de $0,5 \text{ g}$ de amostra); *ii*) MW-UV utilizando HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} (decomposição de $0,5 \text{ g}$ de amostra); e *iii*) SRC utilizando HNO_3 na concentração de 8 mol l^{-1} (decomposição de $0,8 \text{ g}$ de amostra). Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se apresentados na Fig. 17.

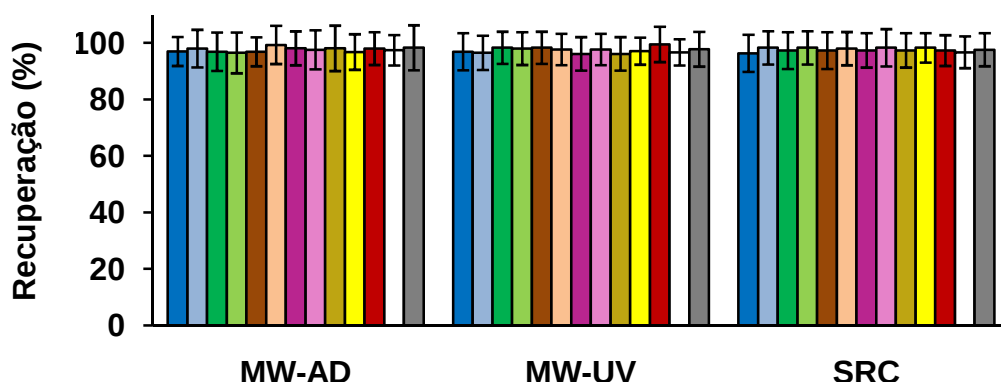


Figura 17 – Recuperações para As ■, Cd ■, Co ■, Cr ■, Cu ■, Mn ■, Mo ■, Ni ■, Pb ■, Pd ■, Pt ■, Rh ■ e Sr ■ determinadas por ICP-MS em amostras de margarina adicionadas de solução com concentração conhecida dos analitos, decompostas por métodos variados (n = 3).

Como pode ser observado, os resultados obtidos com a realização dos ensaios de recuperação, apresentados na Figura 17, demonstram recuperações entre 94 e 99% para todos os analitos, indiferente do método de decomposição utilizado. É importante também destacar que os resultados obtidos para as recuperações utilizando o método MW-AD apresentaram RSDs de até 9%, enquanto que os métodos de decomposição por MW-UV e SRC apresentaram resultados com RSDs inferiores a 7%, o que confirma a boa precisão de todos os métodos avaliados.

Assim, pode-se estimar que os três métodos otimizados sejam capazes de fornecer resultados exatos. Isto foi comprovado pela decomposição do CRM BCR 414 utilizando as soluções ácidas otimizadas em cada método. Os resultados obtidos para as determinações elementares por ICP-MS no CRM após a decomposição pelos variados métodos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações elementares determinadas por ICP-MS no CRM BCR 414, após decomposição utilizando diferentes métodos de preparo de amostra (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$).

Elemento	Concentração obtida (ng g ⁻¹)			Concentração certificada (ng g ⁻¹)
	MW-AD	MW-UV	SRC	
As	6465 $\pm$ 381	6670 $\pm$ 379	66154 $\pm$ 4101	6820 $\pm$ 280
Cd	369 $\pm$ 23	365 $\pm$ 17	379 $\pm$ 22	383 $\pm$ 14
Co	1417 $\pm$ 89	1384 $\pm$ 65	1357 $\pm$ 66	1430 $\pm$ 60*
Cr	23395 $\pm$ 1427	23347 $\pm$ 1144	23086 $\pm$ 969	23800 $\pm$ 1200
Cu	29205 $\pm$ 1519	29205 $\pm$ 1489	28408 $\pm$ 1704	29500 $\pm$ 1300
Mn	291525 $\pm$ 14285	291824 $\pm$ 17509	286442 $\pm$ 15468	299000 $\pm$ 13000
Mo	1305 $\pm$ 73	1363 $\pm$ 72	1378 $\pm$ 69	1350 $\pm$ 200*
Ni	19364 $\pm$ 1258	18067 $\pm$ 831	18612 $\pm$ 1117	18800 $\pm$ 800
Pb	3926 $\pm$ 177	3856 $\pm$ 201	3859 $\pm$ 166	3970 $\pm$ 190
Sr	256824 $\pm$ 12841	256824 $\pm$ 15666	256563 $\pm$ 14367	261000 $\pm$ 25000*
V	7816 $\pm$ 437	8043 $\pm$ 386	8019 $\pm$ 441	8100 $\pm$ 180
Zn	110149 $\pm$ 6609	107024 $\pm$ 5886	112716 $\pm$ 7214	111600 $\pm$ 2500

*Valores informados.

Como pode ser observado na Tabela 5, não houve diferença significativa (teste *t* de Student, ao nível de 95% de confiança) entre as concentrações certificadas no CRM BCR 414 e os valores obtidos por ICP-MS após os variados métodos de preparo de amostra otimizados avaliados. É importante também ressaltar que, considerando que o CRM utilizado não apresenta matriz semelhante à margarina, foi realizada também a decomposição deste material misturado à amostra, na forma de um ensaio de recuperação. Neste caso, as recuperações observadas apresentaram valores entre 93 e 105% para todos os analitos. Estes resultados confirmam a exatidão dos resultados obtidos utilizando os métodos investigados.

Assim, considerando que os três métodos de decomposição assistida por radiação micro-ondas otimizados forneceram digeridos com baixos RCCs, e resultados com satisfatória exatidão e precisão, selecionou-se o método de decomposição por MW-UV como o mais adequado para os ensaios de aplicabilidade em margarinas pertencentes a outras marcas. Este método de decomposição foi escolhido frente aos demais métodos avaliados, por possibilitar o uso de solução com menor concentração ácida, sem perda da eficiência de decomposição, e resultados com RSDs adequados ($\leq 6,1\%$). Além disso, a MW-UV apresentou LODs adequados para determinações elementares em nível traço, os quais não diferem significativamente dos LODs obtidos com os demais métodos avaliados, nem mesmo por SRC, onde foi possível a decomposição de massa mais elevada de amostra.

4.1.5 Determinações elementares em margarinas por ICP-MS após decomposição por MW-UV

Após as avaliações dos diferentes métodos para a decomposição de margarina previamente à determinação elementar por ICP-MS, os quais foram otimizados quanto à maior massa possível de ser decomposta, menor teor de C em solução, e uso de solução com menor acidez, selecionou-se o uso da MW-UV para a decomposição de amostras de margarina variadas. Nesse método, foi possível a decomposição eficiente de até 0,5 g de margarina, utilizando apenas HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} , como solução digestora. Na Tabela 6 encontram-se apresentadas as concentrações elementares determinadas nas amostras avaliadas, as quais foram obtidas com RSDs inferiores a 6,5%.

Tabela 6 – Concentrações elementares determinadas por ICP-MS em digeridos de 0,5 g de margarina por MW-UV utilizando HNO_3 4 mol l^{-1} como solução digestora (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

	Concentração (ng g ⁻¹)												
	As	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Mo	Ni	Pb	Pd	Pt	Rh	Sr
Amostras de margarina sem sal													
M1	< 1,04*	< 1,18*	< 1,30*	51,5 ± 2,7	< 59,3*	27,6 ± 1,4	< 1,09*	159 ± 8	49,8 ± 2,6	< 0,264*	< 0,302*	< 0,283*	39,9 ± 2,2
M2	< 1,04*	< 1,18*	< 1,30*	34,8 ± 1,6	< 59,3*	38,3 ± 1,9	< 1,09*	< 35,6*	33,2 ± 2,1	< 0,264*	< 0,302*	< 0,283*	34,6 ± 1,7
M3	< 1,04*	< 1,18*	< 1,30*	62,9 ± 3,6	< 59,3*	< 18,9*	< 1,09*	121 ± 7	33,6 ± 1,9	< 0,264*	< 0,302*	< 0,283*	33,6 ± 1,6
M4	< 1,04*	11,9 ± 0,7	< 1,30*	135 ± 8	< 59,3*	33,4 ± 1,5	< 1,09*	170 ± 9	58,4 ± 2,7	< 0,264*	< 0,302*	< 0,283*	45,4 ± 2,6
M5	< 1,04*	4,34 ± 0,21	< 1,30*	131 ± 6	< 59,3*	< 18,9*	< 1,09*	120 ± 6	39,0 ± 1,9	< 0,264*	< 0,302*	< 0,283*	50,3 ± 2,4
Amostras de margarina com sal													
M6	27,3 ± 1,25	4,85 ± 0,29	< 1,30*	29,2 ± 1,4	< 59,3*	59,9 ± 2,9	3,15 ± 0,15	74,7 ± 4,0	86,3 ± 4,9	< 0,264*	< 0,302*	< 0,283*	290 ± 13
M7	29,9 ± 1,58	< 1,18*	< 1,30*	56,7 ± 2,7	< 59,3*	< 18,9*	7,38 ± 0,37	70,4 ± 4,1	65,4 ± 4,0	< 0,264*	< 0,302*	< 0,283*	606 ± 28

*Limites de detecção do método para os respectivos elementos.

Cabe ressaltar que as determinações elementares em margarinas do tipo com sal foram precedidas de um estudo visando verificar a ocorrência de possíveis interferências por Na nas determinações por ICP-MS (FRASER; BEAUCHEMIN, 2000). Desta forma, as amostras foram analisadas em diluições decrescentes, sendo adicionadas de solução de referência contendo os analitos, com o intuito de verificar a ocorrência de interferências a partir das recuperações obtidas. Assim, foi possível obter recuperações satisfatórias (95 - 101%) para todos os analitos, tanto nas amostras diluídas com fatores diversos, quanto nas amostras analisadas na forma concentrada, o que permitiu verificar a ausência de interferência pela presença de Na. Este fato pode ser explicado pelos baixos teores de Na presentes nas amostras (0,6%, segundo informação dos fabricantes), os quais provavelmente não são passíveis de promover interferências perceptíveis nas determinações por ICP-MS. Cabe ainda ressaltar que, considerando os teores de NaCl adicionados às margarinas, os quais segundo a literatura correspondem a 0,1 - 0,3% da massa do produto (MORETTO; FETT, 1998), acredita-se que existam outras fontes de Na que justifiquem o teor de Na, informado pelos fabricantes.

Como pode ser observado a partir dos resultados obtidos para as determinações elementares nas amostras de margarina avaliadas, As e Mo foram detectados apenas nas amostras que contêm sal em sua composição. Da mesma forma, maiores concentrações de Pb e Sr foram verificadas nesse tipo de amostra, se comparado ao produto sem sal, sugerindo, assim, uma relação da presença desses elementos com o sal adicionado ao produto. Cabe ressaltar que, especialmente no caso do As, este resultado pode estar vinculado à ocorrência de uma interferência do tipo poliatômica, entre argônio e cloro, a qual pode ser verificada promovendo-se a determinação de As utilizando uma técnica livre deste tipo de interferências.

No que se refere aos relatos da literatura para a presença destes elementos em margarinas, foi possível a comparação somente das concentrações de Pb, considerando que não foram encontrados trabalhos que se referissem a determinações de As, Mo e Sr em margarina. Assim, os resultados obtidos para Pb em margarinas no presente estudo foram sempre superiores aos relatos da literatura para este tipo de amostras (BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997; SZLYK; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2004; MARTORELL *et al.*, 2011; MENDIL, 2012).

Diferentemente do que foi observado para As, Mo, Pb e Sr, as concentrações de Cr e Ni obtidas para as margarinas avaliadas, apresentaram-se em menores valores nas amostras com sal, se comparadas às amostras sem sal. Em comparação com os relatos da literatura, os valores obtidos para Cr foram superiores ao informado por Souza (2007), enquanto que os valores obtidos para Ni foram inferiores ao relatado pela maioria dos autores (ELLEN; BOSCH-TIBBRESMA; DOUMA, 1978; KREBS, 1987; ANWAR *et al.*, 2004; SOUZA, 2007; LODYGA-CHRUSCINSKA; SYKULA-ZAJAC; OLEJNIK, 2012). Assim, o fato da concentração de Ni obtida nessas amostras ser superior apenas ao relatado por Buldini, Ferri e Sharma (1997), pode estar relacionado com o tipo de margarina utilizado e seu processo de fabricação, considerando que as altas concentrações deste elemento observadas por alguns autores podem ser atribuídas a um tratamento ineficiente após processo de hidrogenação utilizando Ni como catalisador (ANWAR *et al.*, 2004).

Cádmio, quando detectado nas amostras, não apresentou diferença de concentração entre as margarinas com e sem sal. As concentrações obtidas para este elemento em margarinas, quando detectáveis foram concordantes com relatos de outros autores (BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997; SOUZA, 2007; MARTORELL *et al.*, 2011; MENDIL, 2012). Por sua vez, Mn, quando detectado nas amostras, mostrou-se inferior ao relatado na literatura (SOUZA, 2007).

Os elementos Co e Cu, apesar de determinados em margarina por outros autores (BULDINI; FERRI; SHARMA, 1997; ANWAR *et al.*, 2004; SZLYK; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2004; SOUZA, 2007; MENDIL, 2012), não foram detectados nas amostras avaliadas neste estudo. Também apresentaram concentrações inferiores aos LODs do método os elementos Pd, Pt e Rh, os quais foram investigados por serem possíveis escolhas da indústria em um provável processo de hidrogenação.

Com relação à legislação, considerando que são expressas concentrações máximas em margarina apenas para alguns elementos, pode-se considerar que as amostras avaliadas encontram-se de acordo com os limites estabelecidos para As, Cu, Ni e Pb (ANVISA – RDC 42, 2013; BRASIL – DECRETO 55871, 1965; BRASIL – PORTARIA 685, 1998; FAO/WHO CODEX STAN 32, 1981). Para os demais

elementos, não foi possível a comparação com a legislação, considerando que não são expressos limites máximos para suas concentrações em margarinas.

Assim, a partir dos resultados referentes às concentrações elementares em margarinas apresentados na Tabela 6, pode-se estimar que as recomendações diárias de ingestão para Mn, Mo, Ni e Cr podem ser atingidas pela ingestão aproximada de 183, 0,3, 6 e 3,5 kg de margarina, respectivamente. Além, destes elementos, são também recomendados limites para a ingestão semanal de As, Cd e Pb, de acordo com a massa corpórea do indivíduo. Dessa forma, considerando-se uma pessoa com aproximadamente 70 kg, seria necessária a ingestão de cerca de 35, 41 e 20 kg de margarina por semana para que fossem atingidos os limites máximos de ingestão recomendados para As, Cd e Pb, respectivamente (WHO, 1996; IOM, 2003).

4.1.6 Considerações Finais

Neste estudo, em que foi avaliada a possibilidade de decomposição de amostras de margarina por diferentes métodos, para a posterior determinação elementar por ICP-MS, foram obtidos resultados satisfatórios quanto ao uso de ácido diluído como única solução digestora. No método de decomposição assistido por radiação micro-ondas, foi possível decompor 0,5 g de margarina utilizando HNO_3 6 mol l^{-1} . Quando a decomposição foi assistida tanto pela radiação micro-ondas quanto pela radiação ultravioleta, pôde-se utilizar HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} para a decomposição da mesma massa de amostra. Por sua vez, no método assistido por radiação micro-ondas em câmara única de reação, a massa máxima de amostra decomposta no sistema foi de 0,8 g, utilizando para isto HNO_3 na concentração de 8 mol l^{-1} . Cabe ressaltar que pelo uso dos métodos otimizados foi verificado um teor de carbono nos digeridos sempre inferior a 150 mg l^{-1} .

Assim, considerando que em todos os métodos foi possível a decomposição satisfatória de margarina, com resultados com boa precisão e exatidão, o método por MW-UV foi selecionado como o mais adequado dentre os avaliados, devido ao uso da menor concentração ácida possível. Utilizando esse método, foi possível a decomposição de 0,5 g desta matriz com elevado teor de gordura, utilizando apenas ácido nítrico diluído (4 mol l^{-1}) como solução digestora, e posterior determinação

elementar em amostras dos tipos com e sem sal. As determinações realizadas apresentaram adequada exatidão, baixos valores de RSD e LOD, bem como reduzidos valores de branco.

Com relação às determinações elementares nas amostras de margarina, foram verificadas concentrações variadas para diversos elementos, sendo que alguns valores possivelmente têm relação com a presença de sal no produto. Dentre os elementos que podem estar relacionados com processos de hidrogenação dos ingredientes da margarina, foi verificada a presença de Ni em praticamente todas as amostras, ainda que de acordo com os limites estabelecidos pela legislação, permitindo estimar que os fabricantes destes produtos ainda utilizam a hidrogenação como forma de preparo da fase lipídica componente da margarina.

4.2 Chocolate: Avaliação da decomposição ácida assistida pelas radiações micro-ondas e ultravioleta para a posterior determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP-MS

Considerando os resultados satisfatórios obtidos com a utilização do método de preparo de amostras por MW-UV nos estudos com margarina, este método foi selecionado para a aplicação em amostras de chocolate. Assim, os estudos com chocolate se restringiram a otimização do método MW-UV e sua aplicação em diferentes tipos de chocolate, visando a subsequente determinação de elementos potencialmente tóxicos por ICP-MS.

Cabe ressaltar que para os procedimentos de otimização do método, foi selecionada aleatoriamente uma amostra de chocolate ao leite, denominada CL1. As demais amostras de chocolates ao leite, chocolates brancos e chocolates à base de cacau foram decompostas por MW-UV utilizando as condições otimizadas. Além disso, amostras de cacau em pó, o qual constitui um importante ingrediente dos chocolates ao leite e à base de cacau, foram também avaliadas neste trabalho, sendo submetidas aos mesmos procedimentos otimizados para as amostras de chocolate.

4.2.1 Caracterização das amostras de chocolate

Os primeiros ensaios realizados com as amostras de chocolate visaram a caracterização destes produtos. Estes ensaios foram conduzidos utilizando amostras aleatoriamente selecionadas, sendo uma amostra de chocolate ao leite, uma amostra de chocolate branco, e quatro amostras de chocolate à base de cacau, ou com concentração informada deste constituinte (28%, 40%, 70% e 85%). Cabe ressaltar que a amostra de chocolate ao leite caracterizada físico-quimicamente é a mesma que foi posteriormente utilizada nos procedimentos de otimização do método de preparo de amostras (CL1).

Os ensaios de caracterização realizados com as amostras de chocolate restringiram-se às determinações dos teores de umidade, cinzas e gordura, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 7. Além disso, foi também

determinado o teor de carbono elementar na amostra CL1, com o objetivo de promover sua comparação com os teores de C dissolvido nos digeridos obtidos com cada condição avaliada e, assim, verificar a eficiência do método.

Tabela 7 – Resultados obtidos nos procedimentos de caracterização das amostras de chocolate (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

Amostra	Umidade (%)	Cinzas (%)	Gordura (%)	Carbono (%)
Chocolate ao leite	1,7 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 3	49 $\pm$ 3
Chocolate branco	2,2 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 2	-
Chocolate (28% de cacau)	3,5 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	33 $\pm$ 2	-
Chocolate (40% de cacau)	1,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 2	-
Chocolate (70% de cacau)	1,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	40 $\pm$ 3	-
Chocolate (85% de cacau)	2,1 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,3	39 $\pm$ 3	-

Como pode ser observado na Tabela 7, com exceção do chocolate com 28% de cacau, todos os demais chocolates apresentaram teores de umidade inferiores a 3,0%, como preconizado pela ANVISA (ANVISA – RDC 12 CNNPA, 1978). Entretanto, os valores obtidos neste trabalho para os teores de umidade em chocolates ao leite e chocolates à base de cacau foram um pouco superiores aos relatados para estes produtos na TACO (2011), os quais são de 1,3% para chocolates ao leite, e 1,0% em chocolates do tipo amargo.

Com relação aos teores de cinzas obtidos para as amostras avaliadas, pode-se observar valores semelhantes aos relatados pela TACO (2011) para chocolates ao leite (1,7%) e chocolates à base de cacau (1,8%), considerando os desvios padrão obtidos para os resultados. No entanto, é interessante enfatizar que as amostras com maior conteúdo de cacau em sua composição (70 e 80%), apresentaram teor de cinzas um pouco superior às demais amostras avaliadas, sugerindo a presença de maior conteúdo mineral nestes chocolates.

No que se refere às determinações dos teores de gordura, com exceção dos chocolates contendo 70 ou 85% de cacau em sua composição, as demais amostras

apresentaram valores inferiores a 35%, estando de acordo com o descrito por Zambiasi (2010). Ainda, considerando os desvios padrão dos resultados, esses teores aproximam-se bastante dos valores expressos pela TACO para chocolates ao leite e chocolates à base de cacau (30,3 e 29,9%, respectivamente), assim como dos teores expressos para gordura em chocolate descritos em outros trabalhos da literatura (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007; TORRES-MORENO *et al.*, 2015).

Por sua vez, o teor de carbono obtido por análise elementar para a amostra de chocolate ao leite selecionada para os ensaios de otimização do método (CL1), foi da ordem de 49%. Como esperado, este valor é um pouco inferior ao observado para a amostra de margarina sem sal (64%), a qual contém também maiores concentrações de gordura (cerca de 80%), e menor conteúdo mineral.

4.2.2 Otimização do método de decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta

Os ensaios de otimização do método MW-UV para a decomposição de chocolate foram conduzidos utilizando a amostra de chocolate ao leite, denominada como CL1. Nesses ensaios preliminares, foram avaliados a concentração de HNO_3 utilizada como solução digestora (2, 4, 7 ou $14,4 \text{ mol l}^{-1}$), a maior massa possível de ser eficientemente decomposta no sistema, e o tempo de irradiação com micro-ondas.

Inicialmente, massas de 0,5 g de chocolate foram decompostas por MW-UV, segundo o programa de irradiação A, descrito no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*), utilizando diferentes concentrações de HNO_3 . Este estudo foi conduzido, com o intuito de conhecer a menor concentração ácida em que seria possível a decomposição eficiente desta massa de amostra. Assim, foi determinado o RCC e a acidez dos digeridos obtidos com cada condição ácida avaliada, os quais encontram-se apresentados na Figura 18.

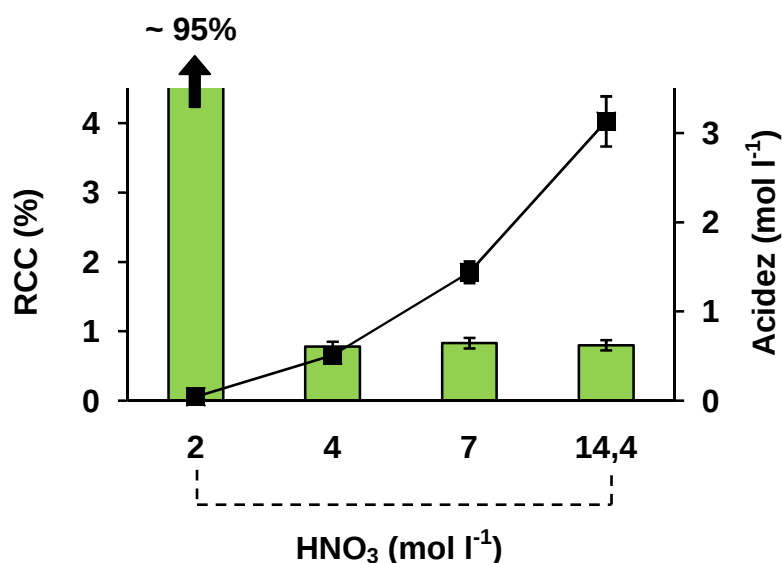


Figura 18 – Teores de carbono residual ■ e acidez ■ dos digeridos de 0,5 g de chocolate ao leite por MW-UV, utilizando concentrações variadas de HNO₃ como solução digestora (n = 3).

Como pode ser observado, utilizando HNO₃ na concentração de 2 mol l⁻¹, não foi obtida uma boa eficiência de decomposição, considerando-se que nesta condição foi verificado um RCC de aproximadamente 95%, o qual corresponde a um teor de carbono dissolvido nos digeridos da ordem de 7800 mg l⁻¹. Entretanto, quando foi utilizado HNO₃ nas concentrações 4, 7 ou 14,4 mol l⁻¹, o RCC obtido foi sempre em torno de 0,8% (correspondente a um teor de carbono dissolvido nos digeridos inferior a 70 mg l⁻¹), o qual usualmente não causa interferências nas análises por ICP-MS (VANHOE *et al.*, 1994; GRINDLAY *et al.*, 2013). A elevada eficiência de decomposição observada nessas condições, pode ser atribuída ao sinergismo entre as radiações micro-ondas e ultravioleta, com a formação de espécies altamente oxidantes, permitindo assim a eficiente decomposição da amostra, mesmo utilizando somente ácido diluído como solução digestora (FLORIAN; KNAPP, 2001; PEREIRA *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2015).

Com relação à acidez dos digeridos, como esperado, foi verificado um aumento dos valores com o uso de soluções ácidas mais concentradas, apesar do RCC nestas condições ser praticamente o mesmo (~ 0,8%) para concentrações de HNO₃ iguais ou superiores a 4 mol l⁻¹. É importante destacar que quando essa

concentração ácida (4 mol l^{-1}) foi utilizada, um consumo de cerca de 0,025 mol de HNO_3 (correspondente à aproximadamente 85% da quantidade de ácido adicionada) foi observado para a eficiente decomposição de 0,5 g de chocolate, resultando em digeridos com acidez em torno de $0,5 \text{ mol l}^{-1}$. Entretanto, utilizando HNO_3 na concentração de 2 mol l^{-1} , foram obtidos digeridos com acidez em torno de $0,045 \text{ mol l}^{-1}$, a qual corresponde a um consumo de cerca de 98% da quantidade de ácido utilizada. Assim, este reduzido valor para a acidez dos digeridos obtidos utilizando HNO_3 2 mol l^{-1} , pode explicar a baixa eficiência de decomposição (RCC de aproximadamente 95%) verificada com o uso desta concentração de solução, considerando que, provavelmente, não houve ácido suficiente no meio reacional para que ocorresse uma eficiente decomposição da amostra.

Assim, considerando a boa eficiência de decomposição de 0,5 g de chocolate obtida utilizando-se HNO_3 em concentrações iguais ou superiores a 4 mol l^{-1} , foram realizados posteriormente, ensaios de recuperação dos analitos nestas condições ácidas. Estes ensaios de recuperação foram realizados após uma varredura prévia, realizada por ICP-MS nos digeridos de chocolate por MW-UV utilizando HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} , com o intuito de verificar quais analitos poderiam ser quantificados na amostra. Dessa forma, as determinações elementares nos digeridos de chocolate contemplaram os seguintes elementos: As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb e Sr.

Os resultados obtidos com a realização dos ensaios de recuperação, apresentados na Figura 19, demonstram recuperações entre 95 e 99% para todos os analitos, utilizando HNO_3 em concentração igual ou superior a 4 mol l^{-1} como solução digestora. Assim, a solução de HNO_3 com concentração de 4 mol l^{-1} foi selecionada para a continuidade dos estudos, tendo em vista que foi a menor concentração ácida dentre as avaliadas, onde foi possível a obtenção de adequada eficiência de decomposição (RCC $\sim 0,8\%$), com satisfatória recuperação dos analitos.

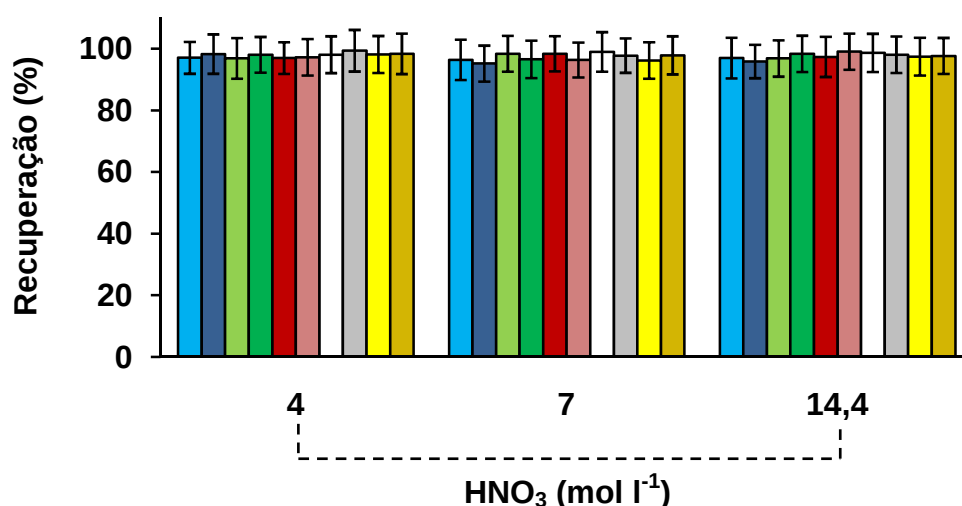


Figura 19 – Recuperações para As ■, Cd ■, Co ■, Cr ■, Cu ■, Mn ■, Mo ■, Ni ■, Pb ■ e Sr ■ determinadas por ICP-MS em amostras de chocolate adicionadas de solução com concentração conhecida dos analitos, decompostas por MW-UV utilizando HNO₃ nas concentrações de 4, 7 ou 14,4 mol l⁻¹ como solução digestora (n = 3).

É importante destacar que usando a solução de HNO₃ com concentração igual a 4 mol l⁻¹, não foi necessário o ajuste de acidez previamente às determinações por ICP-MS. Isto foi possível, considerando que para a construção da curva de calibração foi utilizada solução de HNO₃ 5% (aproximadamente 0,7 mol l⁻¹), a qual tem praticamente a mesma acidez dos digeridos de chocolate utilizando HNO₃ 4 mol l⁻¹ (aproximadamente 0,5 mol l⁻¹). Entretanto, quando foram utilizadas soluções de HNO₃ mais concentradas (7 ou 14,4 mol l⁻¹) para a decomposição do chocolate por MW-UV, foi necessária a realização de diluição dos digeridos previamente a determinação dos analitos por ICP-MS, tendo em vista a elevada acidez destas soluções (aproximadamente 1,5 e 3,0 mol l⁻¹, respectivamente), em comparação com a acidez dos padrões da curva de calibração.

Tendo selecionado a solução de HNO₃ com concentração de 4 mol l⁻¹ para a decomposição das amostras de chocolate, o segundo parâmetro avaliado foi a massa máxima de amostra a ser eficientemente decomposta no sistema. Esta avaliação foi realizada considerando a acidez determinada nos digeridos de 0,5 g de chocolate (aproximadamente 0,5 mol l⁻¹), a qual sugere a disponibilidade de ácido para a decomposição de maiores massas de amostra. Assim, foi avaliada a

decomposição de massas de 0,6 e 0,7 g de chocolate por MW-UV, utilizando a solução ácida previamente selecionada. Os digeridos obtidos com essas condições tiveram o RCC determinado.

Desta forma, quando massas de 0,6 g de chocolate foram decompostas por MW-UV, foi verificado um RCC bastante semelhante ao obtido para a decomposição de 0,5 g de amostra (0,8%, correspondente a um teor de carbono dissolvido nos digeridos de cerca de 80 mg l^{-1}). Estes digeridos apresentaram acidez em torno de $0,3 \text{ mol l}^{-1}$. Entretanto, quando massas de 0,7 g de amostra foram decompostas, apesar da acidez presente nos digeridos (em torno de $0,17 \text{ mol l}^{-1}$), o valor de RCC obtido para os digeridos foi de cerca de 2% (2,5 vezes o RCC observado para a decomposição de 0,6 g de chocolate). Apesar desse ser um baixo valor numérico, é importante ressaltar que representa um teor de carbono dissolvido nos digeridos da ordem de 230 mg l^{-1} , sendo bastante superior ao observado para os digeridos de 0,6 g de chocolate (80 mg l^{-1}).

Assim, considerando que o teor de carbono obtido nos digeridos de 0,7 g de chocolate pode causar problemas na determinação por ICP-MS, como por exemplo, depósitos na interface do instrumento, reduzindo a sensibilidade das determinações (GRINDLAY *et al.*, 2013), a massa de 0,6 g foi selecionada como a maior massa possível de ser decomposta eficientemente pelo método MW-UV utilizando HNO_3 4 mol l^{-1} como solução digestora. É importante mencionar que, de acordo com os trabalhos presentes na literatura, essa é a maior massa de chocolate eficientemente decomposta em sistemas fechados (JALBANI *et al.*, 2009; GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015).

Posteriormente, assim como para a amostra de margarina, avaliou-se a decomposição de chocolate por MW-UV utilizando a circulação de ar no modo FAN 2 durante a irradiação com micro-ondas, considerando que uma melhora nas decomposições utilizando a MW-UV sob esta condição tem sido relatada na literatura (PEREIRA *et al.*, 2013; PEREIRA; WILTSHE; KNAPP 2014). Entretanto, para a decomposição de chocolate, da mesma forma que o verificado para a amostra de margarina, a utilização do modo de circulação de ar FAN 2 na cavidade do forno durante a irradiação com micro-ondas não promoveu melhorias na

decomposição da amostra. Os valores de RCC obtidos para os digeridos de 0,6 g de chocolate sob essa condição foram da ordem de 0,8%, assim como o observado nas decomposições anteriores, utilizando a circulação de ar no modo FAN 1. Assim, acredita-se que a influência de uma maior circulação de ar na cavidade do forno durante a irradiação com micro-ondas esteja relacionada ao tipo de amostra a ser decomposta, sendo que para chocolate e margarina, não foram verificadas alterações na eficiência de decomposição, mediante a alteração desta condição.

Ainda, visando a redução do tempo de decomposição das amostras, foi avaliada a decomposição de 0,6 g de chocolate por MW-UV, utilizando os programas de irradiação B e C, descritos no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*). Cabe enfatizar que, assim como ocorreu com a amostra de margarina, quando foi utilizado o programa de irradiação A para a decomposição de chocolate, não foi atingida a potência máxima de irradiação programada (900 W). Isto ocorreu por causa da elevação da pressão do sistema ao nível máximo programado (80 bar) logo após o alcance da potência de 550 W. Desta forma, como medida de segurança do sistema, a irradiação foi reduzida para cerca de 500 W, a qual foi mantida até o final do tempo de decomposição estabelecido. Assim, a potência máxima de irradiação nos programas B e C foi estabelecida em 550 W, enquanto que o tempo de permanência sob esta irradiação foi reduzido para 20 min (programa de irradiação B) ou 10 min (programa de irradiação C), em detrimento dos 40 min de irradiação observados no programa de irradiação A. A rampa de aquecimento foi mantida, considerando a possibilidade da ocorrência de reações violentas, dado o elevado conteúdo orgânico da amostra (IEGGLI *et al.*, 2011 (a)). A temperatura máxima alcançada em todos os programas de irradiação avaliados foi da ordem de 200 °C, sendo atingida com o alcance da pressão máxima do sistema.

Entretanto, assim como verificado para a amostra de margarina, os valores de RCC para os digeridos de 0,6 g de chocolate obtidos pela utilização dos programas de irradiação B e C, foram da ordem de 1,6 e 2,7%, respectivamente. Esses RCCs, correspondentes a teores de carbono dissolvido nos digeridos da ordem de 133 e 267 mg l⁻¹, respectivamente, representam no mínimo o dobro do RCC observado para a decomposição da mesma massa de chocolate utilizando o programa de irradiação A. Dessa forma, dentre os programas avaliados, o programa de irradiação com 40 min de permanência na máxima potência de irradiação alcançada

(programa de irradiação A), foi selecionado como o mais adequado para a decomposição de chocolate, tendo em vista a maior eficiência de decomposição verificada nesta condição.

4.2.3 Método comparativo: Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

Como forma de avaliar a influência da radiação ultravioleta na decomposição da amostra de chocolate, foi realizado um ensaio comparativo através da decomposição de 0,6 g de chocolate por MW-AD, utilizando 10 ml de HNO_3 na concentração 4 mol l^{-1} , e sob irradiação de acordo com o programa A (condições otimizadas para o método MW-UV). Dessa forma, a única diferença nesse procedimento foi a ausência da lâmpada emissora de radiação ultravioleta no interior do frasco de decomposição.

Os digeridos obtidos pelo método MW-AD apresentaram aspecto límpido, e acidez da ordem de $0,24 \text{ mol l}^{-1}$. Entretanto, como esperado, a decomposição por MW-AD foi menos eficiente (RCC da ordem de 1,6%, correspondente a um teor de carbono dissolvido de cerca de 160 mg l^{-1}) quando comparada a decomposição por MW-UV. Este RCC verificado para os digeridos por MW-AD, correspondente ao dobro do valor obtido para os digeridos por MW-UV, nas mesmas condições, confirma o efeito da radiação ultravioleta na decomposição de chocolate, mesmo utilizando solução ácida diluída como agente digestor.

4.2.4 Avaliação da exatidão

A exatidão do método utilizando MW-UV foi avaliada pela decomposição do CRM BCR 414 sob as condições otimizadas para a amostra de chocolate. Os resultados obtidos para as determinações elementares neste CRM encontram-se apresentados na Tabela 8, onde se pode verificar que não houve diferença significativa (teste t de Student, ao nível de 95% de confiança) entre as concentrações certificadas no CRM e os valores obtidos para todos os analitos.

Considerando-se que o CRM BCR 414 não tem matriz semelhante à amostra, foi realizada também a decomposição deste misturado ao chocolate, na forma de um ensaio de recuperação. Ainda, podem também ser considerados na avaliação da exatidão, os ensaios de recuperação realizados com solução de referência, descritos no item 4.2.2, referentes à otimização da concentração da solução digestora. Tanto no ensaio de recuperação realizado utilizando solução de referência, quanto no ensaio de recuperação utilizando CRM, foram obtidas recuperações entre 95 e 104%, comprovando a exatidão do método MW-UV utilizando HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} , como solução digestora.

Tabela 8 – Determinações elementares em CRM BCR 414 por ICP-MS, após decomposição por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$).

Elemento	Concentração obtida (ng g^{-1})	Concentração certificada (ng g^{-1})
As	6670 ± 379	6820 ± 280
Cd	365 ± 17	383 ± 14
Co	1384 ± 65	$1430 \pm 60^*$
Cr	23347 ± 1144	23800 ± 1200
Cu	29205 ± 1489	29500 ± 1300
Mn	291824 ± 17509	299000 ± 13000
Mo	1363 ± 72	$1350 \pm 200^*$
Ni	18067 ± 831	18800 ± 800
Pb	3856 ± 201	3970 ± 190
Sr	256824 ± 15666	$261000 \pm 25000^*$

*Concentrações informadas.

4.2.5 Determinações elementares em chocolates por ICP-MS após decomposição por MW-UV

Após a otimização do método de decomposição por MW-UV e avaliação da sua exatidão, foi realizada a sua aplicação para amostras de chocolate branco e chocolate ao leite, pertencentes a marcas variadas. Essas amostras foram

escolhidas para os ensaios iniciais de aplicabilidade do método, por representarem os tipos de chocolates mais consumidos no Brasil. Os resultados obtidos nestas determinações encontram-se apresentados na Tabela 9.

Como pode ser observado, alguns elementos, como Cu, Mn e Sr, podem ser considerados majoritários em chocolates, dadas as elevadas concentrações em que se encontram, as quais são sempre superiores às concentrações dos demais elementos avaliados. Concentrações de Cu semelhantes às obtidas neste trabalho são relatadas na literatura para chocolates ao leite, por autores variados (IEGGLI *et al.*, 2011 (a); REHMAN; HUSNAIN, 2012; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). Entretanto, existem também na literatura relatos de concentrações de Cu neste tipo de chocolate que diferem bastante das obtidas neste trabalho (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008), o que pode estar associado à origem do chocolate avaliado. Da mesma forma, para os valores de Mn obtidos neste trabalho em chocolates ao leite, foi observada concordância com alguns relatos da literatura (IEGGLI *et al.*, 2011 (a); VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015), embora em outros trabalhos sejam relatadas concentrações diferentes para este elemento (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; REHMAN; HUSNAIN, 2012). Quanto às concentrações destes elementos em chocolates do tipo branco, os valores obtidos neste trabalho foram de acordo com os valores expressos por Villa *et al.* (2015). Por sua vez, os resultados obtidos para Sr, em ambos os tipos de chocolate avaliados, não puderam ser comparados com dados da literatura, devido a inexistência de trabalhos que relatem esta determinação nesse tipo de amostra.

Tabela 9 – Resultados das determinações elementares realizadas por ICP-MS em chocolates brancos e ao leite decompostos por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

	Concentração (ng g ⁻¹)									
	As	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr
Amostras de chocolates brancos										
CB 1	15,3 $\pm$ 0,7	< 0,981*	7,75 $\pm$ 0,33	71,1 $\pm$ 2,9	681 $\pm$ 30	229 $\pm$ 11	61,4 $\pm$ 4,1	105 $\pm$ 5	< 7,85*	1619 $\pm$ 81
CB 2	12,4 $\pm$ 0,8	< 0,981*	5,98 $\pm$ 0,29	104 $\pm$ 5	304 $\pm$ 15	175 $\pm$ 8	85,4 $\pm$ 4,3	108 $\pm$ 6	15,3 $\pm$ 0,9	976 $\pm$ 51
CB 3	21,7 $\pm$ 1,2	< 0,981*	9,18 $\pm$ 0,47	142 $\pm$ 7	328 $\pm$ 19	264 $\pm$ 16	118 $\pm$ 7,3	97,3 $\pm$ 6,7	13,7 $\pm$ 0,8	1593 $\pm$ 75
Amostras de chocolates ao leite										
CL 1	15,1 $\pm$ 1,0	7,41 $\pm$ 0,36	46,2 $\pm$ 2,4	255 $\pm$ 15	2164 $\pm$ 136	2524 $\pm$ 144	104 $\pm$ 6	559 $\pm$ 33	15,1 $\pm$ 0,7	2619 $\pm$ 141
CL 2	11,7 $\pm$ 0,8	13,7 $\pm$ 0,7	53,8 $\pm$ 3,3	212 $\pm$ 11	2867 $\pm$ 186	2594 $\pm$ 127	77,8 $\pm$ 4,6	538 $\pm$ 29	14,0 $\pm$ 0,9	1546 $\pm$ 75
CL 3	13,0 $\pm$ 0,8	16,1 $\pm$ 0,8	42,0 $\pm$ 2,0	352 $\pm$ 17	2635 $\pm$ 129	1872 $\pm$ 84	80,3 $\pm$ 4,8	381 $\pm$ 23	13,2 $\pm$ 0,6	1912 $\pm$ 101
CL 4	13,6 $\pm$ 0,9	18,2 $\pm$ 1,0	78,8 $\pm$ 4,2	227 $\pm$ 12	2719 $\pm$ 141	3004 $\pm$ 156	67,2 $\pm$ 3,6	652 $\pm$ 41	15,2 $\pm$ 0,9	2188 $\pm$ 133

*Limites de detecção do método para os respectivos elementos.

Cabe também ressaltar que as concentrações observadas para esses elementos (Cu, Mn e Sr) são também mais elevadas em chocolates ao leite, se comparadas aos chocolates brancos. Este mesmo comportamento foi verificado para outros elementos determinados nessas amostras, podendo ser citados Cd, Co, Cr e Ni, sendo verificadas alterações na concentração em até 10 vezes, para alguns elementos, quando comparados os dois tipos de chocolate.

As concentrações obtidas nesse estudo para Cd em chocolates ao leite são concordantes com relatos da literatura (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). Entretanto, como para os demais elementos investigados nessas amostras, relatos divergentes também são encontrados na literatura (DAHIYA *et al.*, 2005; JALBANI *et al.*, 2009; REHMAN; HUSNAIN, 2012). O mesmo pode ser observado com relação aos resultados obtidos para Ni em chocolates ao leite, os quais apesar de mostrar semelhança com alguns relatos da literatura (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; DAHIYA *et al.*, 2005), foram inferiores ao relatado por outros autores (GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; JALBANI *et al.*, 2009; REHMAN; HUSNAIN, 2012). Por sua vez, os resultados obtidos para Co e Cr nos chocolates ao leite, puderam ser comparados com apenas um trabalho existente na literatura, mostrando-se inferiores aos valores relatados (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993). É importante ressaltar que não existem relatos quanto à determinação de Cd, Co, Cr e Ni em chocolates do tipo branco, sendo que os resultados obtidos para estes elementos não puderam ser comparados com dados da literatura.

Por sua vez, as concentrações de As, Mo e Pb não mostraram diferenças significativas nos dois tipos de chocolate avaliados. Os resultados obtidos nessas determinações em chocolates ao leite foram concordantes com relatos da literatura para As (GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008) e Pb (RANKIN *et al.*, 2005; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). No entanto, é importante destacar que alguns autores relatam concentrações de Pb em chocolates ao leite, bastante superiores às obtidas neste estudo (DAHIYA *et al.*, 2005; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; REHMAN; HUSNAIN, 2012). Por sua vez, não foram encontrados na literatura relatos de determinação de Mo em chocolates, impedindo a comparação dos resultados. Da mesma forma, a ausência de relatos de determinações destes

elementos em chocolates brancos, impediu a comparação dos resultados obtidos para este tipo de chocolate.

É importante ressaltar que os valores para Cd, Cu, Mn e Ni, obtidos para chocolates ao leite neste trabalho, são inferiores aos valores relatados pela *U.S. Food and Drug Administration (FDA) Total Diet Study (TDS)* para este tipo de chocolate (24, 3900, 4540 e 921 ng g⁻¹, respectivamente). Entretanto, para Pb, a concentração obtida neste estudo é bastante semelhante ao valor reportado pela FDA (Pb: 13 ng g⁻¹) (FDA, 2014). As concentrações de As e Mo em chocolates ao leite são relatadas pela FDA como inferiores aos limites de quantificação dos métodos utilizados por este órgão, enquanto que para as concentrações dos demais elementos investigados neste trabalho, não há relatos por parte da FDA (FDA, 2014).

Com relação aos elementos cujas concentrações são limitadas em chocolates pela ANVISA (As, Cd e Pb), foram obtidos resultados inferiores ao limite máximo recomendado (200 ng g⁻¹ para qualquer um destes três analitos em chocolates com teor de cacau inferior a 40%) (ANVISA – RDC 42, 2013). Desta forma, no que se refere à concentração destes elementos, os produtos avaliados estão de acordo com a legislação.

De forma geral, pode-se dizer que as concentrações da maioria dos elementos avaliados é menor no chocolate branco, se comparado ao chocolate ao leite, sendo que no caso do Cd, no chocolate branco foram obtidas concentrações inferiores ao LOD do método para este elemento (0,98 ng g⁻¹). Assim, pode-se estimar que estes elementos presentes em concentrações mais elevadas em chocolates ao leite, tenham como fonte os ingredientes utilizados na fabricação deste produto, principalmente o cacau, como relatado na literatura (JALBANI *et al.*, 2009; DAHIYA *et al.*, 2005; REHMAN; HUSNAIN, 2012, BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014). Entretanto, é importante mencionar que variações na concentração de elementos tóxicos em chocolates podem também estar associadas ao processo de fabricação do chocolate assim como às embalagens em que os produtos são estocados (JALBANI *et al.*, 2009).

Assim, a partir destes resultados, foi investigada a presença destes mesmos elementos em chocolates contendo diferentes concentrações de cacau, visando relacionar as possíveis diferenças nas concentrações obtidas com o aumento da

concentração de cacau apresentada pelo produto. Os resultados obtidos nestas determinações encontram-se apresentados na Tabela 10.

Como pode ser observado, a partir dos resultados expressos na Tabela 10, foi possível a quantificação de todos os elementos investigados nos chocolates à base de cacau, sendo que em sua maioria foi verificado um aumento de concentração de acordo com a concentração de cacau informada. Esse aumento de concentração só não foi verificado para As, o qual foi determinado com valores na mesma faixa de concentração observada para os chocolates brancos e ao leite; e Pb, para o qual, apesar de apresentar concentrações mais elevadas nos chocolates à base de cacau se comparado aos chocolates ao leite, não foi observada uma relação direta da concentração deste elemento com o teor de cacau informado no produto.

É importante destacar que as concentrações de As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb, determinadas em chocolates à base de cacau apresentaram concordância com valores relatados da literatura para estes elementos em chocolates com esta característica (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; DAHIYA *et al.*, 2005; RANKIN *et al.*, 2005; JALBANI *et al.*, 2009; IEGGLI *et al.*, 2011 (a); REHMAN; HUSNAIN, 2012; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; BARTOS; MAJAK; LESZCZYNSKA, 2014; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014; YANUS *et al.*, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). Entretanto, para a maioria desses elementos (Cd, Co, Cr, Mn e Pb), foram também encontrados na literatura relatos com concentrações discrepantes das determinadas neste trabalho (JORHEM; SUNDSTRÖM, 1993; DAHIYA *et al.*, 2005; JALBANI *et al.*, 2009; REHMAN; HUSNAIN, 2012; YANUS *et al.*, 2014). Molibdênio foi determinado em concentrações inferiores ao único relato encontrado na literatura para a quantificação deste elemento em chocolates à base de cacau (YANUS *et al.*, 2014). Por sua vez, as concentrações de estrôncio não puderam ser comparadas com a literatura, devido a ausência de trabalhos que relatassem esta determinação.

Tabela 10 – Resultados das determinações elementares realizadas por ICP-MS em chocolates com diferentes concentrações de cacau decompostos por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

Amostra (% cacau)	Concentração (ng g ⁻¹)									
	As	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr
A (28)	15,5 $\pm$ 0,8	12,5 $\pm$ 0,76	54,9 $\pm$ 2,9	346 $\pm$ 17	2 691 $\pm$ 134	2838 $\pm$ 128	47,7 $\pm$ 2,1	949 $\pm$ 47	45,0 $\pm$ 2,4	2424 $\pm$ 145
B (40)	9,82 $\pm$ 0,46	21,7 $\pm$ 1,3	130 $\pm$ 6	465 $\pm$ 19	5587 $\pm$ 335	6114 $\pm$ 366	64,9 $\pm$ 3,4	1583 $\pm$ 71	55,1 $\pm$ 2,5	3 139 $\pm$ 141
C (40)	9,60 $\pm$ 0,46	31,9 $\pm$ 1,5	210 $\pm$ 9	293 $\pm$ 13	7517 $\pm$ 338	7250 $\pm$ 362	98,9 $\pm$ 6,0	1812 $\pm$ 105	51,4 $\pm$ 3,1	3304 $\pm$ 172
D (41)	6,14 $\pm$ 0,24	30,1 $\pm$ 1,4	198 $\pm$ 10	369 $\pm$ 19	7251 $\pm$ 377	7894 $\pm$ 394	72,5 $\pm$ 3,5	1940 $\pm$ 105	50,3 $\pm$ 3,0	3304 $\pm$ 165
E (43)	4,59 $\pm$ 0,24	38,8 $\pm$ 1,9	226 $\pm$ 13	525 $\pm$ 24	6329 $\pm$ 291	7142 $\pm$ 321	71,1 $\pm$ 3,0	1883 $\pm$ 93	51,2 $\pm$ 2,9	3427 $\pm$ 202
F (50)	9,57 $\pm$ 0,51	32,2 $\pm$ 1,7	213 $\pm$ 11	539 $\pm$ 34	7037 $\pm$ 380	6979 $\pm$ 418	93,9 $\pm$ 8,5	1816 $\pm$ 94	62,9 $\pm$ 3,0	2882 $\pm$ 173
G (70)	8,60 $\pm$ 0,48	45,4 $\pm$ 1,9	273 $\pm$ 12	445 $\pm$ 24	8213 $\pm$ 492	9218 $\pm$ 599	103 $\pm$ 5	2150 $\pm$ 133	55,3 $\pm$ 2,5	43 71 $\pm$ 197
H (70)	22,9 $\pm$ 1,0	44,8 $\pm$ 2,3	286 $\pm$ 11	1309 $\pm$ 68	8479 $\pm$ 441	10458 $\pm$ 471	132 $\pm$ 6	2448 $\pm$ 130	49,2 $\pm$ 2,6	4 412 $\pm$ 255
I (70)	20,2 $\pm$ 1,0	48,6 $\pm$ 2,8	275 $\pm$ 17	1138 $\pm$ 52	7558 $\pm$ 453	9752 $\pm$ 507	94,0 $\pm$ 6,1	2189 $\pm$ 122	42,1 $\pm$ 2,4	4457 $\pm$ 201
J (70)	10,6 $\pm$ 0,6	53,2 $\pm$ 3,2	418 $\pm$ 21	1222 $\pm$ 59	11545 $\pm$ 531	13896 $\pm$ 667	114 $\pm$ 7	4427 $\pm$ 265	39,8 $\pm$ 1,6	4424 $\pm$ 234
K (85)	8,97 $\pm$ 0,47	53,0 $\pm$ 3,3	354 $\pm$ 16	952 $\pm$ 57	12098 $\pm$ 629	14062 $\pm$ 801	97,7 $\pm$ 4,8	3260 $\pm$ 166	47,8 $\pm$ 2,5	5765 $\pm$ 271
L (85)	6,62 $\pm$ 0,38	54,1 $\pm$ 2,4	486 $\pm$ 19	929 $\pm$ 48	13451 $\pm$ 659	15075 $\pm$ 919	94,8 $\pm$ 5,0	3196 $\pm$ 153	46,9 $\pm$ 2,2	5824 $\pm$ 361

Com relação aos limites máximos estabelecidos pela ANVISA para a presença de As (400 ng g^{-1}), Cd (300 ng g^{-1}) e Pb (400 ng g^{-1}) em chocolates com mais de 40% de cacau em sua composição, pode-se destacar que todos os chocolates à base de cacau avaliados neste trabalho estão de acordo com a legislação (ANVISA – RDC 42, 2013). No entanto, para os demais elementos não são expressos pela legislação limites máximos de concentração.

Assim, a partir dos resultados referentes às concentrações elementares em chocolates apresentados nas Tabelas 9 e 10, pode-se estimar que pela ingestão de 25 g de chocolate ao leite ou 15 g de chocolate à base de cacau, podem ser atingidas as recomendações diárias de ingestão para Cu e Mo. Por sua vez, a ingestão diária recomendada para Cr, Ni e Mn pode ser atingida pelo consumo de 3,5 kg de chocolate ao leite, ou 1 kg de chocolate à base de cacau. Além, destes elementos, são também recomendados limites máximos de ingestão semanal para As, Cd e Pb, de acordo com a massa corpórea do indivíduo. Dessa forma, considerando-se uma pessoa com aproximadamente 70 kg, seria necessária a ingestão de cerca de 70, 27 e 117 kg de chocolate ao leite por semana para que fossem atingidos os limites máximos de ingestão recomendados para As, Cd e Pb, respectivamente. No que se refere à ingestão de chocolates à base de cacau, as recomendações de ingestão máxima para As, Cd e Pb podem ser atingidas pelo consumo semanal respectivo de 46, 9 e 32 kg do produto (WHO,1996; IOM, 2003).

Posteriormente, considerando a relação observada entre as elevadas concentrações da maioria dos elementos com o teor de cacau informado nos produtos analisados, foi também investigada a presença destes elementos em amostras de cacau em pó. Essas amostras foram submetidas ao mesmo método otimizado para as amostras de chocolate, sendo que os resultados obtidos para as determinações por ICP-MS encontram-se expressos na Tabela 11. Cabe ressaltar, que mesmo sendo observadas elevadas concentrações dos elementos investigados nas amostras de cacau avaliadas, o que permite estimar que o cacau pode ser uma importante fonte desses elementos para o chocolate, não é possível correlacionar os resultados obtidos para as amostras de cacau com as amostras de chocolate, tendo em vista que não se tem conhecimento sobre a origem do cacau utilizado para a produção dos chocolates analisados.

Tabela 11 – Concentrações elementares determinadas por ICP-MS em amostras de cacau em pó decompostas por MW-UV (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

Elemento	Concentração (ng g ⁻¹)			
	Cacau 1	Cacau 2	Cacau 3	Cacau 4
As	49,1 $\pm$ 2,5	50,2 $\pm$ 2,2	77,5 $\pm$ 3,2	102 $\pm$ 6
Cd	376 $\pm$ 23	174 $\pm$ 9	123 $\pm$ 6	192 $\pm$ 7
Co	995 $\pm$ 45	118 $\pm$ 6	903 $\pm$ 44	1298 $\pm$ 70
Cr	36300 $\pm$ 2105	18494 $\pm$ 1202	34078 $\pm$ 1908	51774 $\pm$ 3106
Cu	31971 $\pm$ 2014	35901 $\pm$ 2082	24834 $\pm$ 1192	44829 $\pm$ 2510
Mn	31952 $\pm$ 1502	73199 $\pm$ 2928	28764 $\pm$ 1898	53877 $\pm$ 2748
Mo	451 $\pm$ 23	329 $\pm$ 15	391 $\pm$ 21	703 $\pm$ 41
Ni	14589 $\pm$ 613	12605 $\pm$ 668	11082 $\pm$ 665	23839 $\pm$ 1454
Pb	314 $\pm$ 20	387 $\pm$ 21	703 $\pm$ 28	1125 $\pm$ 46
Sr	20135 $\pm$ 1188	24865 $\pm$ 1492	13279 $\pm$ 664	26129 $\pm$ 1019

É importante também enfatizar que para as determinações elementares em cacau por ICP-MS foi observada a ocorrência de interferências na etapa de determinação. Estas interferências, não identificadas, foram sanadas através da calibração por adição de analito, utilizando a própria amostra, como descrito no capítulo 3 (*Materiais e Métodos*).

Assim como foi observado para as amostras de chocolate, os elementos presentes em maiores concentrações nas amostras de cacau foram Cr, Cu, Mn, Ni e Sr, confirmando que esta pode ser uma importante fonte destes elementos para o chocolate. É importante ressaltar que as concentrações obtidas para As, Cd, Co, Mn e Ni, foram concordantes com relatos da literatura para a determinação destes elementos em cacau em pó (GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013; YANUS *et al.*, 2014). Entretanto, para Cr, Mo e Pb, foram obtidas concentrações superiores às relatadas na literatura (RANKIN *et al.*, 2005; GÜLDAS, 2008; GÜLDAS; DAGDELEN; BIRICIK, 2008; YANUS *et al.*, 2014). Cobre e Sr não puderam ter suas concentrações comparadas com relatos da literatura para amostras de cacau, devido a ausência de trabalhos que expressem estas determinações.

Cabe ainda enfatizar que além das determinações elementares em chocolates e seus ingredientes, principalmente cacau, os trabalhos da literatura têm abrangido também as amostras de chocolate em pó e achocolatados utilizados para o preparo de bebidas (ONIANWA *et al.*, 1999; PEDRO; OLIVEIRA; CADORE, 2006; SILVA *et al.*, 2006; PEIXOTO; OLIVEIRA; CADORE, 2012; SCANCAR; ZULIANI; MILACIC, 2013). Nesses produtos, compostos basicamente de cacau, açúcar, soja, lecitina, sabor e vitaminas, sendo muitas vezes acrescidos de soro de leite ou leite em pó (PEDRO; OLIVEIRA; CADORE, 2006), os autores indicam a presença de elevadas concentrações de Cu e Mn, em comparação as demais concentrações elementares avaliadas, sendo semelhante ao observado neste trabalho para amostras de chocolate e cacau.

4.2.6 Brancos analíticos e limites de detecção

O método otimizado permitiu a decomposição de chocolates de diversos tipos para a posterior determinação de vários elementos, utilizando apenas ácido diluído como solução digestora. Os resultados obtidos apresentaram RSDs sempre inferiores a 7%, e LODs apresentados na Tabela 12.

Estes LODs permitiram a determinação dos analitos em quase todas as amostras avaliadas, com exceção dos casos verificados para a determinação de Cd e Pb em chocolates brancos, os quais apresentaram concentrações para estes elementos inferiores ao LOD. Além disso, os valores de branco para todos os analitos (Tabela 12) obtidos pelo uso de ácido diluído na etapa de preparo da amostra foram sempre inferiores aos obtidos pelo uso de ácido concentrado (cerca de 4 vezes inferior). Ainda, cabe enfatizar que LODs mais elevados para alguns elementos foram ocasionados pela obtenção de concentrações um pouco mais elevadas nos brancos analíticos.

Tabela 12 – Limites de detecção e concentrações elementares nos brancos analíticos obtidos com a utilização do método de decomposição por MW-UV com HNO_3 4 mol l^{-1} e determinação por ICP-MS ($n = 3$).

Elemento	LOD (ng g^{-1})	Concentração média dos brancos analíticos (μl^{-1})
As	0,873	0,008
Cd	0,981	0,010
Co	1,01	0,015
Cr	15,7	0,178
Cu	49,4	0,781
Mn	15,8	0,243
Mo	1,58	0,022
Ni	29,7	0,467
Pb	7,85	0,078
Sr	14,9	0,278

Quanto aos LODs para as determinações em cacau, realizadas mediante calibração com curva de adição de analito, estes foram considerados como iguais aos obtidos para as determinações em chocolates. Esta medida foi tomada considerando que, como o branco analítico nestes casos não sofre interferência da matriz, não necessita ter as concentrações determinadas por meio de curva de adição de analito.

4.2.7 Considerações Finais

Utilizando o método otimizado nesse estudo, foi possível pela primeira vez, a decomposição eficiente de amostras de chocolate, utilizando apenas ácido diluído e sem a adição de outros agentes oxidantes. É importante destacar que não houve a necessidade de introdução de etapas adicionais previamente às determinações por ICP-MS, como diluições ou filtrações, como citado em outros trabalhos da literatura (YANUS *et al.*, 2014; VILLA; PEREIRA; CADORE, 2015). Assim, a análise direta dos

digeridos foi possível tendo em vista que uso de ácidos diluídos evitou a ocorrência de interferências por ácidos concentrados na etapa de determinação, e a boa eficiência de decomposição observada permitiu a obtenção de digeridos com baixos RCCs e sem a presença de material particulado em solução.

Dessa forma, foram determinadas as concentrações de diversos elementos presentes em chocolates dos tipos branco, ao leite e à base de cacau, por ICP-MS após decomposição por MW-UV utilizando somente 10 ml de HNO_3 4 mol l^{-1} , como solução digestora para a decomposição eficiente de até 0,6 g de amostra. Foi possível também verificar que a concentração da maioria dos elementos investigados apresenta relação com a quantidade de cacau no produto, o que motivou a realização de análises em amostras de cacau em pó, confirmando que esta pode ser uma das principais fontes de contaminação elementar dos chocolates. Assim, o método otimizado para as determinações elementares em chocolate tem potencial para aplicabilidade em indústrias, dadas às vantagens que apresenta em relação aos métodos comumente utilizados com esta finalidade.

5 CONCLUSÕES

De forma geral, os resultados obtidos neste trabalho comprovam a possibilidade de decomposição de amostras de margarina e chocolate, as quais contêm elevado percentual de gordura em sua composição, utilizando apenas ácidos diluídos. Este foi um dos objetivos do trabalho, considerando que essas são matrizes de difícil decomposição e, também, porque o uso de ácidos diluídos na etapa de preparo de amostras tem sido encorajado atualmente, buscando condições de decomposição menos drásticas, com maior segurança, menor geração de resíduos, menores custos, menores valores de branco e reduzidos LODs.

Ainda, os resultados obtidos nesse trabalho permitiram o conhecimento da possibilidade da decomposição de amostras de margarina e chocolate utilizando métodos ainda não mencionados na literatura para este tipo de amostra. Esses métodos geraram digeridos compatíveis com a determinação elementar direta por ICP-MS, sem necessidade de etapas de diluição ou filtração previamente às análises.

As amostras de margarina puderam ser decompostas eficientemente por três métodos assistidos por radiação micro-ondas, sendo que em todos foi possível a utilização de apenas ácidos diluídos como solução digestora. No método de decomposição por MW-AD, foi realizada a decomposição eficiente de 0,5 g de margarina utilizando HNO_3 na concentração de 6 mol l^{-1} , enquanto que no procedimento por MW-UV, esta mesma massa de amostra pôde ser decomposta utilizando HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} . A possibilidade de uso de solução mais diluída por MW-UV, sem perda de eficiência de decomposição pode ser atribuída ao sinergismo entre as radiações micro-ondas e ultravioleta, contribuindo assim para uma maior eficiência na decomposição da matéria orgânica.

Por sua vez, utilizando SRC, foi possível a decomposição eficiente de até 0,8 g de margarina, mediante o uso de HNO_3 com concentração igual a 8 mol l^{-1} . Apesar desta ser uma concentração ácida mais elevada, se comparada à utilizada nos demais métodos avaliados, este método pode ser uma importante alternativa quando se objetiva a determinação de elementos em baixas concentrações, considerando os menores LODs obtidos com sua utilização, decorrentes da maior

massa decomposta no sistema. Entretanto, devido a necessidade de uso de ácido mais concentrado, o qual promove um aumento da concentração elementar nos brancos, esta diminuição do valor dos LODs acaba não sendo muito pronunciada. No caso da decomposição das amostras de margarina, por exemplo, esta diferença entre os LODs dos métodos avaliados não foi significativa o suficiente para motivar a escolha do método SRC como o mais satisfatório.

Assim, o método de decomposição por MW-UV foi selecionado para a decomposição de margarina neste trabalho, devido a possibilidade da decomposição eficiente (reduzidos RCCs) de 0,5 g de amostra utilizando apenas HNO_3 na concentração de 4 mol l^{-1} , como solução digestora. Nesta condição foram decompostas por MW-UV marcas variadas de margarina, dos tipos com e sem sal, sendo que as determinações elementares puderam ser realizadas de forma direta por ICP-MS, sem a ocorrência de interferências.

Considerando os resultados satisfatórios obtidos pela aplicação deste método para a decomposição de margarinas e posterior determinação elementar nas amostras por ICP-MS, o método foi também otimizado para a aplicação em amostras de chocolate em barra. Assim, massas de até 0,6 g de chocolates dos tipos branco, ao leite e à base de cacau foram eficientemente decompostos (reduzidos RCCs) por MW-UV utilizando apenas HNO_3 com concentração igual a 4 mol l^{-1} como solução digestora.

Com os resultados obtidos para os diferentes tipos de chocolate, foi possível perceber uma possível relação entre a concentração de alguns elementos determinados e o teor de cacau nestes produtos. Dessa forma, amostras de cacau em pó foram também avaliadas utilizando o método proposto, como forma de comprovar os relatos de que este ingrediente do chocolate pode ser uma das principais fontes de contaminação do produto final.

Assim, cabe ressaltar que o método de decomposição por MW-UV, selecionado neste trabalho para aplicação em amostras de margarina e chocolate, é bastante seguro, e proporciona elevada frequência analítica, podendo ser realizadas até 8 decomposições simultaneamente. Além disso, o procedimento permitiu a obtenção de resultados satisfatórios a partir do uso de soluções ácidas diluídas e sem a necessidade de reagentes auxiliares de decomposição, o que vai ao encontro

dos requisitos preconizados pela Química Verde, visto que é utilizada uma reduzida quantidade de reagentes, com consequente menor geração de resíduos.

Os resultados obtidos para os elementos regulamentados pela legislação vigente em margarinas e chocolates foram concordantes com as concentrações máximas permitidas. Entretanto, é importante ressaltar que não existem recomendações legais quanto à presença de muitos elementos sabidamente tóxicos à saúde, que são encontrados nesses produtos. Além disso, mesmo para os elementos controlados pela legislação, há de se considerar que muitas vezes as recomendações são baseadas em dados ultrapassados, ou não estão relacionadas ao consumo atual dos produtos. Como exemplo, pode ser mencionado a presença de Ni, observada em margarinas e chocolates, a qual apesar de ser regulamentada em margarina, por uma legislação de 1965, e que não reflete a realidade dos produtos atuais, sequer é mencionada na legislação vigente para chocolates. Considerando que este elemento é um conhecido alérgeno, e que as dermatites relacionadas ao seu contato ou ingestão acometem grande parte da população, seria adequado que fossem feitas atualizações das legislações a respeito deste elemento nos alimentos em geral.

Finalmente, é importante destacar que o uso de MW-UV e ICP-MS permitiu a determinação de vários elementos em margarinas com e sem sal, chocolates de diversos tipos, e cacau em pó, evidenciando que este é um procedimento adequado para a introdução em análises de rotina. Ainda, a possibilidade de utilizar somente ácidos diluídos como reagentes digestores, faz deste método uma importante alternativa aos procedimentos usualmente aplicados a estas amostras.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB - Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados. Disponível em: <http://www.abicab.org.br/>. Acesso em: 29 out 2015.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, p.290-298, 2007.

ANSARI, R.; KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; ARAIN M. B.; WAGAN, M. D.; JALBANI, N.; AFRIDI, H. I. & SHAH, A. Q. Variation in Accumulation of Heavy Metals in Different Verities of Sunflower Seed Oil with The Aid of Multivariate Technique. **Food Chemistry**, v.115, p. 318-323, 2009.

ANTHEMIDIS, A. N.; ARVANITIDIS, V.; STRATIS, J. A. On-line emulsion formation and multi-element analysis of edible oils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.537, p.271–278, 2005.

Anton Paar GmbH, Microwave Sample Preparation System, Software version v1.27-Synt, Graz, Austria, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CNNPA Resolução RDC nº 12 de 24 de julho de 1978. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 29 Out 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CNS/MS Resolução RDC nº 04 de 24 de novembro de 1988. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 04 Jan 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 387, de 05 de agosto de 1999. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 04 Jan 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 23 de 15 de fevereiro de 2005. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 04 Jan 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 29 out 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 29 out 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 29 out 2015.

ANWAR, F.; KAZI, T. G., SALEEM, R.; BHANGER, M. I. Rapid determination of some trace metals in several oils and fats. **Grasas y Aceites**, v.55, p.160-168, 2004.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v.20, p.638-643, 1997.

BALAKOS, M. W.; HERNANDEZ, E. Catalyst characteristics and performance in edible oil hydrogenation. **Catalysis Today**, v.35, p.415 – 425, 1997.

BARTOS, A.; MAJAK, I.; LESZCZYNSKA, J. Uptake and assimilability of nickel in the course of systemic allergy: Implications for elimination diet. **Food Research International**, v.55, p.412-417, 2014.

BECKER, J. S. **Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications**, England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

BECKETT, S. T. **Fabricación y Utilización Industrial Del Chocolate**. Zaragoza: Editorial Acibia, S. A., 1994. 432 p.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. L. M.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MORTARI, S. R. Evaluation of digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.29, p.332-338, 2014 (a).

BIZZI, C. A.; NOBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. **Analytica Chimica Acta**, v.837, p.16-22, 2014 (b).

- BIZZI, C. A.; NOBREGA, J. A.; BARIN, J. S. Diluted Acids in Microwave-Assisted Wet Digestion. In: FLORES, E. M. M. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Oxford: Elsevier, 2014. p.179-204.
- BORGES, D. L. G.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v.18, p.58-67, 2005.
- BRASIL - Presidência da República. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 23 jan 2014.
- BRASIL - Ministério da Saúde. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso: 23 jan 2014.
- BULDINI, P. L.; FERRI, D.; SHARMA, J. L. Determination of some inorganic species in edible vegetable oils and fats by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.789, p.549-555, 1997.
- BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.975, p.47-70, 2002.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 207p.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Ficha de Informação Toxicológica. Disponível em: <<http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/servicos/informacoes-toxicologicas>> Acesso: 29 out 2015.
- CINDRIC, I. J.; ZEINER, M.; STEFFAN, I. Trace elemental characterization of edible oils by ICP-AES and GF AAS. **Microchemical Journal**, v.85, p.136–139, 2007.
- CHIARA, V. L.; SICHIERI, R.; CARVALHO, T. S. F. Trans fatty acids of some foods consumed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Nutrição**, v.16, p.227-233, 2003.
- COSTA, A. C. S.; KRUG, F. J.; OLIVEIRA, E.; NÓBREGA, J. A.; MATIAS, T. B. Decomposição e solubilização de sólidos inorgânicos. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.141-183.

DAHIYA, S.; KARPE, R.; HEDGE, A. G.; SHARMA, R. M. Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.517-522, 2005.

ELLEN, G.; BOSCH-TIBBESMA, G. V. D.; DOUMA, F. F. Nickel content of various dutch foodstuffs. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v.166, p.145-147, 1978.

ELSON, C. M.; BEM, E. M.; ACKMAN, R. G. Determination of heavy metals in a menhaden oil after refining and hydrogenation using several analytical methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, p.1024-1026, 1981.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization. CODEX Alimentarius International Food Standards. CODEX STAN 32-1981 – Codex Standard for Margarine. Disponível: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 29 out 2015.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization. CODEX Alimentarius International Food Standards. CODEX ALINORM 97/14 – Report of the sixteenth session of the codex committee on cocoa products and chocolate. Disponível: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 29 out 2015.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization. CODEX Alimentarius International Food Standards. CODEX STAN 256-2007 – Standard for fat spreads and blended spreads. Disponível: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 29 out 2015.

FERNANDEZ, M. B.; PIQUERAS, C. M.; TONETTO, G. M.; CRAPISTE, G.; DAMIANI, D. E. Hydrogenation of edible oil over Pd-Me/Al₂O₃ catalysts (Me = Mo, V and Pb). **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.233, p.133–139, 2005.

FDA – US Food and Drug Administration, Total Diet Study - Elements Results Summary Statistics Market Baskets 2006 through 2011, USA: College Park, 2014. 167p.

FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; ARRUDA, M. A. Z. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.252-275.

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

FRASER, M. M.; BEAUCHEMIN, D. Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 55, p. 1705-1731, 2000.

GABROVSKA, M.; KRSTIC, J.; EDREVA-KARDJIEVA, R.; STANKOVIC, M.; JOVANOVIC, D. The influence of the support on the properties of nickel catalysts for edible oil hydrogenation. **Applied Catalysis A: General**, v.299, p.73–83, 2006.

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

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

GRINDLAY, G.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGT, M.; VANHAECKE, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v.86, p.42-49, 2013.

GÜLDAS, M. Comparison of digestion methods and trace elements determination in chocolates with pistachio using atomic absorption spectrometry. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.47, p.92-99, 2008.

GÜLDAS, M.; DAGDELEN, A. F.; BIRICIK, G. F. Determination and comparison of some trace elements in different chocolate types produced in Turkey. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.6, p.90-94, 2008.

HUNTER, J. E. Dietary *trans* fatty acids: Review of recent human studies and food industry responses. **Lipids**, v.41, p.976-992, 2006.

IEGGLI, C. V. S.; BOHRER, D.; NASCIMENTO, P. C.; CARVALHO, L. M.; GOBO, L. A. Determination of aluminum, copper and manganese content in chocolate samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a microemulsion technique. **Journal of Composition and Analysis**, v.24, p.465-468, 2011 (a).

IEGGLI, C. V. S.; BOHRER, D.; NASCIMENTO, P. C.; CARVALHO, L. M. Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron in emulsified chocolate samples by flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.124, p.1189-1193, 2011 (b).

IEGGLI, C. V. S.; BOHRER, D.; NASCIMENTO, P. C.; CARVALHO, L. M. Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable oils, margarine and butter after sample emulsification. **Food Additives and Contaminants Part B**, v.28, p.640-648, 2011 (c).

Instruction Sheet B83IB51A, Microwave-assisted UV digestion (MUV), Anton Paar. Disponível em: <http://www.anton-paar.com>. Acesso em: 15 ago 2015.

IOM - Institute of Medicine of the National Academies. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC: The National Academies Press, 2002, p.773.

IOM - Institute of Medicine of the National Academies. **Dietary reference intakes: Applications in Dietary Planning**. Washington, DC: The National Academies Press, 2003, p.255.

JALBANI, N.; KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; ARAIN, M. B.; AFRIDI, H. I.; SHEERAZI, S. T.; ANSARI, R. Application of fractional factorial design and Doehlert matrix in the optimization of experimental variables associated with the ultrasonic-assisted acid digestion of chocolate samples for aluminum determination by atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC International**, v.90, p.1682-1688, 2007.

JALBANI, N.; KAZI, T. G.; AFRIDI, H. I.; ARAIN, M. B. Determination of Toxic Metals in Different Brand of Chocolates and Candies, Marketed in Pakistan. **Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry**, v.10, p.48-52, 2009.

JANUZZI, G. S. B.; KRUG, F. J.; ARRUDA, M. A. Z. Application of the slurry technique to the determination of selenium in fish samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.12, p.375-378, 1997.

JORHEM, L.; SUNDSTRÖM, B. Levels of lead, cadmium, zinc, copper, nickel, chromium, manganese, and cobalt in foods on the Swedish market, 1983-1990. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.6, p.223-241, 1993.

KARADJOVA, I.; GIROUSI, S.; ILIADOU, E.; STRATIS, I. Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in milk, cheese and chocolate. **Microchimica Acta**, v.134, p.185-191, 2000.

KORN, M. G. A.; MORTE, E. S. B.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. C.; 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, p.67-92, 2008.

KREBS, B. Direct determination of nickel in margarine. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.328, p.388-389, 1987.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A. A Sequência Analítica. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.1-12.

KRUG, F. J.; SANTOS JR., D. Erros sistemáticos no preparo de amostras. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.13-58.

KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M.; AMARASIRIWARADENA, C. J.; FONER, H.; MARTINES, L. Determination of the residual carbon content bu inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after decomposition of biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.7, p.845-850, 1992.

LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; FERREIRA, A. T.; BARBOSA JR., F.; GUAITA, U. Tungsten-rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in fish slurries by

electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.14, p.269-274, 1999.

LIMBECK, A. Microwave-assisted UV-digestion procedure for the accurate determination of Pd in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 575, p. 114-119, 2006.

LIU, J.; GOYER, R. A.; WAALKES, M. P. Efeitos Tóxicos dos Metais. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2ª Ed., Porto Alegre: AMGH Editora, 2012, p.325-335.

LLORENT-MARTINEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNANDEZ-DE CORDOVA, M. L.; DOMINGUZ-VIDAL A. & RUIZ-MEDINA, A. Investigation by ICP-MS of Trace Element Levels in Vegetable Edible Oils Produced in Spain. **Food Chemistry**, v.127, p.1257-1262, 2011.

LODYGA-CHRUSCINSKA, E.; SYKULA-ZAJAC, A.; OLEJNIK, D. Determination of nickel in Polish brands of margarines. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v.5, p.251-254, 2012.

LUQUE-GARCIA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, p.90-98, 2003.

MAGALHÃES, C. E. C.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.184-251.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://www.crmvgo.org.br>> Acesso em: 23 jan 2014.

MARTORELL, I.; PERELLÓ, G.; MARTÍ-CID, R.; LLOBET, J. M.; CASTELL, V.; DOMINGO, J. L. Human exposure to arsenic, cadmium, mercury, and lead from foods in Catalonia, Spain: Temporal trend. **Biological Trace Element Research**, v.142, p.309-322, 2011.

MATUSIEWICZ, H. Wet digestion methods. In: MESTER, Z.; STURGEON, R. **Sample preparation for trace element analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2003, p.193-233.

MATUSIEWICZ, H. Systems for Microwave-Assisted Wet Digestion. In: FLORES, E. M. M. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Oxford: Elsevier, 2014. p.77-98.

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; GUARNIERI, R. A. Microwave Heating. In: FLORES, E. M. M. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Oxford: Elsevier, 2014. p.59-75.

MENDIL, D. Determination of Cd (II), Cu (II), and Pb (II) in some foods by FAAS after preconcentration on modified silica gels with thiourea. **Journal of Food Science**, v.77, p.T181-T186, 2012.

MESKO, M. F.; PICOLATO, R. S.; FERREIRA, L. R.; COSTA, V. C.; PEREIRA, C. M. P.; COLEPICOLO, P.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.30, p.260-266, 2015.

MERTENS, W. G.; SWINDELLS, C.E.; TEASDALE, B.F. Trace Metals and the Flavor Stability of Margarine. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p.544-546, 1971.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 150p.

MOUNICOU, S.; SPUZNAR, J.; ANDREY, D.; BLAKE, C.; LOBINSKI, R. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.342-352, 2003.

MULLER, C. C.; MULLER, A. L. H.; PIROLA, C.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. M.; MULLER, E. I. Feasibility of nut digestion using single reaction chamber for further trace element determination by ICP OES. **Microchemical Journal**, v.116, p.255-260, 2014.

MÜLLER, E. I.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; KORN, M. G. A.; FLORES, E. M. M. Wet digestion using microwave heating. In: FLORES, E. M. M. **Microwave-Assisted**

Sample Preparation for Trace Element Determination. Oxford: Elsevier, 2014. p.99-142.

MULLER, A. L. H.; OLIVEIRA, J. S. S.; MELLO, P. A.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, v.136, p.161-169, 2015.

MULTIWAVE 3000: Microwave Reaction System, Graz: Anton Paar GmbH, 2006.

NASH, A. M.; MOUNTS, T. L.; KWOLEK, W. F. Determination of Ultratrace Metals in Hydrogenated Vegetable Oils and Fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, p.811-814, 1983.

NÓBREGA, J. A.; PIROLA, C.; FIALHO, L. L.; ROTA, G.; CAMPOS JORDÃO, C. E. K. M. A.; POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, v.98, p.272-276, 2012.

NOGUEIRA, A. R. A.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Decomposições assistidas por radiação micro-ondas. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.276-325.

NOGUEIRA, A. R. A.; CAVICCHIOLI, A.; KAMOGAWA, M. Y. Decomposições por irradiação com ondas ultravioletas. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.326-340.

NOMURA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.104-128.

NUNES, J. A. **Desenvolvimento de método para a determinação de AG, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio**

alcalino. 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

OLIVEIRA, J. S. S.; PICOLOTO, R. S.; BIZZI, C. A.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted ultraviolet digestion of petroleum coke for the simultaneous determination of nickel, vanadium and sulfur by ICP OES. **Talanta**, v.144, p.1053-1058, 2015.

ONIANWA, P. C.; ADETOLA, I. G.; IWEBUE, C. M. A.; OJO, M. F.; TELLA, O. O. Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks. **Food Chemistry**, v.66, p.275-279, 1999.

PAVAN, R. **Avaliação dos teores de ácidos graxos *trans* em margarinas e cremes vegetais após a resolução RDC 360 (ANVISA)**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEDRO, N. A. R.; OLIVEIRA, E.; CADORE, S. Study of the mineral content of chocolate flavoured beverages. **Food Chemistry**, v.95, p.94-100, 2006.

PEIXOTO, R. R. A.; OLIVEIRA, A.; CADORE, S. Multielemental determinations in chocolate drink powder using multivariate optimization and ICP OES. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.8117-8122, 2012.

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

PEREIRA, J. S. F.; WILTSCHE, H.; KNAPP, G. Microwave-Assisted Ultraviolet Digestion. In: FLORES, E. M. M. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Oxford: Elsevier, 2014. p.205-229.

PerkinElmer-SCIEX, Elan Version 3.0, Software Guide, 1006920 A, 2003, Canadá.

PINHO, D. M. M.; SUAREZ, P. A. Z. A Hidrogenação de Óleos e Gorduras e suas Aplicações Industriais. **Revista Virtual de Química**, v.5, p.47-62, 2013.

- RAMTAHAL, G.; YEN, I. C.; BEKELE, I.; BEKELE, F.; WILSON, L.; SUKHA, B.; MAHARAJ, K. Cost-effective method of analysis for the determination of cadmium, copper, nickel and zinc in cocoa beans and chocolates. **Journal of Food Research**, v.4, p.193-199, 2015.
- RANKIN, C. W.; NRIAGU, J. O.; AGGARWAL, J. K.; ARAWOLO, T. A.; ADEBAYO, K.; FLEGAL, A. R. Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p.1344-1348, 2005.
- REHMAN, S.; HUSNAIN, S. M. Assessment of trace metal contents in chocolate samples by Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Trace Elements Analysis**, v.1, p.1-11, 2012.
- RIBEIRO, A. P. B., MOURA, J. M. L. N., GRIMALDI R., GONÇALVES, L. A. G. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero *trans*. **Química Nova**, v.30, p. 1295-1300, 2007.
- RODRIGUES, J. N.; MANCINI FILHO, J.; TORRES, R. P.; GIOIELLI, L. A. Caracterização físico-química de creme vegetal enriquecido com ésteres de Fitosteróis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p.505-520, 2004.
- SALGADO, P. E. T. Toxicologia de Alimentos. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. 3ª Ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2008, p.577-608.
- SANTOS JR., D.; KRUG, F. J. Amostragem de suspensões. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.129-140.
- SAVCHENKO, V. I.; MAKARYAN, I. A. Palladium Catalyst for the Production of Pure Margarine. **Platinum Metals Review**, v.43, p.74-82, 1999.
- SCANCAR, J.; ZULIANI, T.; MILACIC, R. Study of nickel content in Ni-rich food products in Slovenia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.32, p.83-89, 2013.
- SHIMIZU, F. M. **Composição centesimal e quantificação de ácidos graxos em diferentes marcas de margarinas e cremes vegetais**. 2009. 64f. Dissertação

(Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

SILVA, E. G. P.; SANTOS, A. C. N.; COSTA, A. C. S.; FORTUNATO, D. M. N.; JOSÉ, N. M.; KORN, M. G. A.; SANTOS, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v.82, p.159-162, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, Ed. Bookman, 5ª ed, 2002.

SOARES, F. A. S. **Interesterificação química e enzimática de misturas de estearina de palma, óleo de coco e óleo de canola para a formulação de margarinas com baixa concentração de isômeros *trans***. 2014. 260p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOLOMONS, G., FRYHLE, C., **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 7ª edição, v.1, 2001, p.259-262.

SOUZA, R. M.; MATHIAS, B. M.; SILVEIRA, C. L. P.; AUCÉLIO, R. Q. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry for trace multi element determination in vegetable oils, margarine and butter after stabilization with propan-1-ol and water. **Spectrochimica Acta Part B**, v.60, p.711-715, 2005.

SOUZA, R. M. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de elementos-traço em amostras oleosas e pastosas por ICP OES e ICP-MS**. 2007. 187f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SOULIOTIS, A. G. Determination of nickel in hydrogenated fats by neutron activation analysis. **Analytical Chemistry**, v.36, p.1385-1386, 1964.

STANKOVIC, M.; GABROVSKA, M.; KRSTIC, J.; TZVETKOV, P.; SHOPSKA, M.; TSACHEVA, T.; BANKOVIC, P.; EDREVA-KARDJIEVA, R.; JOVANOVIC, D. Effect of silver modification on structure and catalytic performance of Ni-Mg/diatomite catalysts

for edible oil hydrogenation. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.297, p.54–62, 2009.

STEWART, I. I.; OLESIK, J. W. Steady state acid effects in ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.13, p.1313-1320, 1998.

SZLYK, E.; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A. Determination of Cadmium, Lead, and Copper in Margarines and Butters by Galvanostatic Stripping Chronopotentiometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4064-4071, 2004.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas: NEPA – UNICAMP, 4^a Ed. rev. e ampl., 2011. 161 p.

TORRES-MORENO, M.; TORRESCASANA, E.; SALAS-SALVADÓ, J.; BLANCH, C. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. **Food Chemistry**, v.166, p.125-132, 2015.

Ultrawave – Single Reaction Chamber (SRC), Milestone. Disponível em: <http://www.milestonesci.com>. Acesso em: 15 ago 2015.

VANHOE, H.; GOOSSENS, J.; MOENS, L.; DAMS, R. Spectral interferences encountered in the analysis of biological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.9, p.177-185, 1994.

VIANA, C.; BOHRER, D.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; ROSA, M. B. Emulsified systems for metal determination by spectrometric methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.53, p.49-59, 2014.

VILLA, J. E. L.; PEIXOTO, R. R. A.; CADORE, S. Cadmium and Lead in Chocolates Commercialized in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.8759-8763, 2014.

VILLA, J. E. L.; PEREIRA, C. D.; CADORE, S. A novel, rapid and simple acid extraction for multielemental determination in chocolate bars. **Microchemical Journal**, v.121, p.199-204, 2015.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; GARCIA, I. L.; CÓRDOBA, M. H. Rapid-determination of calcium, magnesium, iron and zinc in flours using flow-injection flame absorption spectrometry for slurry atomization. **Food Chemistry**, v.46, p.307-311, 1993.

WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. Chocolate in Health and Nutrition. London: Springer, 2013. 553 p.

WHO – World Health Organization. Trace elements in human nutrition and health. Geneva: WHO, 1996, 343p.

WORWITZ, W.; LATIMER, G. W. **Official Methods of Analysis of AOAC International Gaithersburg**: AOAC International, 2011.

WURFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid. 1. Carbon conversion during sample decomposition. **Analytica Chimica Acta**, v.226, p.1-16, 1989.

YANUS, R. L.; SELA, H.; BOROJOVICH, E. J. C.; ZAKON, Y.; SAPHIER, M.; NIKOLSKI, A.; GUTFLAIS, E.; LORBER, A.; KARPAS, Z. Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICP-MS study. **Talanta**, v.119, p.1-4, 2014.

YASAR, S. B.; BARAN, E. K.; ALKAN, M. Metal Determinations in Olive Oil. In: BOSKOU, D. **Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions**. Croácia, 2012, p.89-108.

ZAMBIAZI, R. C. **Análise Físico Química de Alimentos**. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 2010. 202p.

ZEINER, M.; STEFFAN, I.; CINDRIC, I. J. Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: A pilot study on the geographical characterization. **Microchemical Journal**, v.81, p.171– 176, 2005.

ZHU, F.; FAN, W.; WANG, X.; QU, L.; YAO, S. Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetable oils consumed in China. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.3081–3085, 2011.