

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação

Preparo de amostras de carnes em micro
escala para determinação de metais por
técnicas de Espectrometria Atômica

Camila Mizette Oliz

Fevereiro de 2012

Camila Mizette Oliz

**Preparo de amostras de carnes em micro escala para
determinação de metais por técnicas de Espectrometria
Atômica**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Medeiros Nunes
Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Pelotas, Fevereiro de 2012.

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Preparo de amostras de carnes em micro escala para determinação de metais por técnicas de Espectrometria Atômica”, de autoria de Camila Mizette Oliz.

Banca examinadora:

.....

Prof^a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes (Orientadora)

.....

Prof^a Dr^a. Angelita da Silveira Moreira

.....

Prof^a Dr^a. Mariana Antunes Vieira

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir”.

Augusto Cury

Dedico esse trabalho aos meus pais José Fernando e Maria Amélia, meus irmãos Diego e Carolina, minha sobrinha Alice, minha cunhada Karla e minha avó Nair, que são minha base e meu porto seguro para tudo e sem eles não teria chegado até aqui. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, antes de tudo e todos, por ter me abençoado e amparado em toda a caminhada até aqui.

Agradeço à minha família por me apoiar em todas as decisões do caminho a seguir, acreditando sempre no meu potencial, e agradeço pela paciência por entender minhas ausências em diversos momentos durante esse período.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Leandro, por estar sempre do meu lado, me incentivando a seguir em frente e nunca deixar-me sentir derrotada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, por me acolher e possibilitar o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Adriane Medeiros Nunes, que além de minha orientadora é uma grande amiga, que sempre esteve à disposição para tirar dúvidas referentes a quaisquer trabalhos, acrescentando diretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança em mim depositada e pelos outros mais variados ensinamentos que me acrescentaram experiências, tanto para o lado profissional quanto pessoal.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro, por disponibilizar as condições necessárias para realização deste trabalho, bem como pelas sugestões referentes a todos os trabalhos desenvolvidos durante esses dois anos de mestrado. Agradeço também pela confiança em mim depositada, pela paciência e pelas inúmeras contribuições para meu crescimento profissional. Muito Obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Mariana Antunes Vieira pela amizade, carinho, paciência e todas as sugestões para obter melhores resultados.

À minha colega de laboratório e Iniciação Científica, Camila Pereira, um agradecimento especial, devido à parceria de estar sempre disposta a ajudar no que fosse possível no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela tua amizade e por tudo!

Aos meus colegas de laboratório: Caroline Santos, Meibel, Eliézer, Eliane, Michele, Tanize, Caroline Dutra, Daiane, Richard, Rafael e Sérgio, por transformar o ambiente de trabalho em um lugar de muita alegria, de companheirismo, e da certeza que muitos momentos ficarão marcados na minha memória e no coração para sempre.

Às minhas colegas de mestrado: Lara e Carla, não apenas pelo coleguismo e sim, pela amizade conquistada.

Aos funcionários do CCQFA, José Marcos, Algemiro, Lucas, Paulinho, Richele e, principalmente, à Djanira por toda amizade.

À Raquel Costa, um agradecimento especial, pela amizade, carinho, conselhos e, por ter sido presente em todos os momentos em que mais precisei. Muito Obrigada.

À minha querida amiga Vera e minhas primas: Andréia e Clariza pelo apoio e carinho.

Às minhas grandes amigas: Amanda Bosenbecker, Aline Duarte, Roberta Martins, Mariana Padilha, Suellen Farias, Melise Laner e Raquel Laner, pela amizade e pelo conforto em momentos difíceis. Amo vocês!!

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Título: Preparo de amostras de carnes em micro escala para determinação de metais por técnicas de Espectrometria Atômica.

Autora: Camila Mizette Oliz

Orientadora: Prof^a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Novas metodologias analíticas vêm sendo desenvolvidas para a determinação de metais em carnes por técnicas de espectrometria atômica, envolvendo praticidade e rapidez desde o preparo da amostra até a análise, a fim de monitorar e atestar a qualidade desses produtos que vêm sendo vastamente consumidos pela população. Assim, neste trabalho foram desenvolvidos procedimentos de preparo de amostras de carnes em micro escala para a determinação de metais por técnicas de espectrometria atômica (F AES e F AAS), visando a determinação de Na e K através da microdigestão com HNO₃, e para Mg e Zn a partir da microsolubilização das amostras em meio alcalino. A exatidão do método de microdigestão proposto para a determinação de Na e K foi verificada através da comparação dos resultados com dois outros métodos de preparo de amostra (microsolubilização em TMAH e ácido fórmico), bem como o uso de diferentes materiais de referência certificada (CRMs). Já para a quantificação de Mg e Zn, a exatidão da metodologia proposta, baseada em uma microsolubilização em meio alcalino, foi feita através da análise de diversos CRMs. Através da comparação dos resultados obtidos para Na e K nas amostras processadas, as quais foram preparadas em diferentes meios e analisadas por F AES e F AAS, foi verificado que estes não apresentaram diferenças significativas a um nível de confiança de 95 % com a aplicação do teste estatístico t-student pareado. Para os resultados de Mg e Zn, as concentrações encontradas em três CRMs apresentaram valores com 95 % de concordância com os valores certificados. Limites de detecção (LD) de 40 µg L⁻¹ para Na e 37 µg L⁻¹ para K através da microdigestão foram obtidos. Valores menores de LDs foram obtidos para ambos os elementos através do uso da microsolubilização alcalina com TMAH, sendo que para Na e K os LDs foram de 29 e 23 µg L⁻¹, respectivamente. Os limites de detecção encontrados para Mg e Zn também foram baixos, comprovando a alta sensibilidade do método de

análise proposto, apresentando LDs de $12 \mu \text{L}^{-1}$ para Mg e $92 \mu\text{g L}^{-1}$ para Zn. As metodologias propostas (microdigestão e microsolubilização) se apresentaram como procedimentos simples, requerendo micro quantidades de amostra e reagentes, provando serem adequadas ao preparo das amostras para posterior determinação dos respectivos elementos por técnicas de espectrometria atômica.

Palavras-chave: microdigestão, microsolubilização, sódio, potássio, magnésio, zinco, carnes, técnicas de espectrometria atômica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado em Química

Pelotas, Fevereiro, 2012.

ABSTRACT

Title: Sample preparation of meats in microscale for determination of metals by Atomic Spectrometry techniques.

Author: Camila Mizette Oliz

Academic Advisor: Prof^a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes

Academic Co-Advisor: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

New analytical methodologies have been developed for determination of metals in meats by spectrometric techniques, involving practicality and speed from the sample preparation to analysis, in order to monitor and certify the quality of these products have been widely consumed by the population. Therefore, in this work, we have developed procedures for microscale sample preparation for determination of metals by Atomic Spectrometry techniques (F AES and F AAS), aiming the determination of Na and K through microdigestion with HNO₃, and of Mg and Zn through microsolvubilization in alkaline medium. The accuracy of the microdigestion method proposed for determination of Na and K was verified by comparing of the results with two other methods of sample preparation (TMAH and formic acid), as well as the use of different certified reference materials (CRMs). For the quantification of Mg and Zn, the accuracy of the proposed methodology, based on a microsolvubilizaçãoin alkaline medium, was performed by analysis of several CRMs. By comparing the results obtained for Na e K in processed samples, which were prepared in different means and analyzed by F AES and F AAS, it was verified that these were not significantly different at a confidence level of 95 % with the application of statistical test t-Student. For the results of Mg and Zn, the concentrations found in three CRMs presented values with 95 % agreement with the certified values. Limits of detection (LODs) of 40 mg L⁻¹ for Na and 37 mg L⁻¹ for K were obtained by microdigestion. Lower LODs values were obtained for both elements through the use of alkaline microsolvubilization with TMAH, and for Na and K the LODs were 29 and 23 mg L⁻¹, respectively. The Limits of detection found for Mg and Zn were also low, proving the high sensitivity of the method of the analysis proposed, with LODs of 12 mg L⁻¹ for Mg and 92 mg L⁻¹ for Zn. The proposed methodologies (Microdigestion and Microsolvubilization) were presented as simple procedures, requiring micro amounts of samples and reagents,

proving to be suitable to prepare samples for subsequent determination of the respective elements by atomic spectrometry techniques.

Keywords: microdigestion, microsolvubilization, sodium, potassium, magnesium, zinc, meats, atomic spectrometric techniques.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Master Dissertation in Chemistry

Pelotas, February, 2012.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais componentes de um Fotômetro de chama convencional.....	17
Figura 2	Esquema das reações físicas e químicas que ocorrem na chama.....	19
Figura 3	Componentes básicos de um espectrômetro de AAS com chama.....	24
Figura 4	Foto ilustrativa de um mini bloco digestor.....	28
Figura 5	Sistema automatizado de Microinjeção na chama.....	30
Figura 6	Microdigestão de uma amostra de carne com HNO ₃	34
Figura 7	Microsolubilização de uma amostra de carne com TMAH.....	36
Figura 8	Estudo da concentração de KCl (mg L ⁻¹).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades das chamas comumente empregadas em F AES e F AAS.....	18
Tabela 2	Parâmetros operacionais empregados para a determinação de Na, K, Mg e Zn nas amostras de carnes por F AAS.....	30
Tabela 3	Teor de umidade encontrado nas diferentes amostras estudadas (n=3).....	37
Tabela 4	Valores da potência indicada no forno microondas e a potência calculada....	38
Tabela 5	Testes de otimização do tempo e potência aplicados nas amostras do CRM 1577c por microdigestão.....	39
Tabela 6	Parâmetros de Mérito para determinação de Na e K em amostras de carnes processadas em meio HNO ₃ por F AES e F AAS.....	40
Tabela 7	Parâmetros de mérito para a determinação de Na e K em carnes processadas por FAES após tratamento com TMAH e Ácido Fórmico.....	40
Tabela 8	Valores obtidos de Na e K em amostras de carnes processadas por F AES e F AAS (n=3).....	42
Tabela 9	Resultados obtidos para Na e K em amostras de carnes processadas preparadas em dois diferentes meios por FAES (n=3).....	43
Tabela 10	Valores de Na encontrados nos CRMs por F AAS e F AES e os valores certificados (n=3).....	44
Tabela 11	Valores de K encontrados nos CRMs por F AAS e F AES e os valores certificados (n=3).....	44
Tabela 12	Parâmetros de mérito para determinação de Mg e Zn em amostras de carnes por F AAS.....	48
Tabela 13	Resultados analíticos para Mg e Zn em meio de TMAH obtidos em três materiais de referência certificados (média ± desvio para n=3) por FAAS.....	49

Tabela 14	Resultados encontrados de Mg nas amostras de carnes em meio de TMAH por F AAS (n=3).....	50
Tabela 15	Concentrações de Zn obtidas em amostras reais de carnes (in natura e processadas) em meio de TMAH por F AAS (n=3).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIB	Produto Interno Bruto
OMS	Organização Mundial da Saúde
PHB	Ácido para-hidroxibenzóico
PPM	Partes por Milhão
PPB	Partes por bilhão
AA	Absorção Atômica, do inglês <i>Atomic Absorption</i>
AES	Espectrometria de Emissão Atômica, do inglês <i>Atomic Emission Spectrometry</i>
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AES	Espectrometria de Emissão Atômica com Chama, do inglês <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i> .
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
GLP	Gás liquefeito de petróleo
LCO	Lâmpada de cátodo oco, do inglês <i>hollow cathode lamp</i>
EDL	Lâmpada de descarga sem eletrodo, do inglês <i>Electrodeless Discharge Lamp</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>

HR-CS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua, do inglês <i>High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i>
PP	Polipropileno
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio, do inglês <i>tetramethylammonium hydroxide</i>
HCOOH	Ácido Fórmico
CRM	Material de Referência Certificada, do inglês <i>Certified Reference Material</i>
LD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
R	Coefficiente de correlação linear
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Carne: demanda, exportações e importância como alimento.....	4
3.2 Influência do processamento industrial nas carnes.....	11
3.2.1 Perdas e ganhos de nutrientes em carnes durante processamentos industriais.....	11
3.2.2 Adição e ação de conservantes à base de Na em produtos cárneos.....	13
3.3 Espectrometria Atômica para determinação de metais.....	15
3.3.1 Técnica de Espectrometria de Emissão Atômica.....	15
3.3.2 Técnica de Espectrometria de Absorção Atômica.....	21
3.4 Métodos convencionais e alternativos de preparo de amostras.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Instrumentos e Parâmetros Instrumentais.....	29
4.1.1 Espectrômetro 1 (F AES).....	29

4.1.2 Espectrômetro 2 (F AAS).....	29
4.2 Reagentes.....	31
4.3 Amostras e Tratamentos das amostras.....	31
4.3.1 Determinação de Na e K em amostras processadas de carnes.....	32
4.3.1.1 Procedimento 1 – Microdigestão (Mineralização com HNO ₃ em sistema fechado).....	32
4.3.1.2 Procedimento 2 – Microsolubilização alcalina com TMAH.....	34
4.3.1.3 Procedimento 3 – Microsolubilização ácida com ácido fórmico.....	35
4.3.2 Determinação de Mg e Zn em amostras processadas e in natura de carnes.....	35
4.3.2.1 Tratamento das amostras para determinação de Mg.....	36
4.3.2.2 Tratamento das amostras para determinação de Zn.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
5.1 Umidade das amostras.....	37
5.2 Resultados de Na e K em amostras de carne processadas.....	39
5.2.1 Estudos de calibração da potência do forno de microondas e otimizações das condições ideais para as microdigestões das amostras.....	38
5.2.2 Parâmetros de Mérito.....	39
5.2.3 Validação da metodologia proposta.....	41
5.2.4 Avaliação dos Resultados.....	44

5.3 Resultados de Mg e Zn em amostras de carnes in natura e processadas.....	45
5.3.1 Parâmetros de Mérito.....	47
5.3.2 Validação da metodologia proposta.....	48
5.3.3 Avaliação dos Resultados.....	49
6 CONCLUSÕES.....	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1INTRODUÇÃO

O Brasil, atualmente apresenta a pecuária como uma das principais atividades rentáveis, contribuindo com aproximadamente 25 % do PIB total, sendo que dados relatam o país como o maior exportador do ranking mundial de carne bovina desde 2005, tendo em vista que a carne brasileira chega a custar um terço da produzida pelos países membros da Comunidade Européia, tornando-se assim, competitivo no mercado internacional [1,2].

A carne bovina é considerada como um alimento de alta densidade nutricional, por ser rica em proteínas, lipídios, vitaminas lipossolúveis e minerais, tais como: Mg, K, P, Se, Cu, Fe, Zn. Dentre estes, os dois últimos ganham um destaque maior por apresentarem um alto valor nutricional, cujos valores presentes na dieta estão associados diretamente ao consumo deste alimento. Sendo assim, um dos maiores desafios da nutrição moderna vêm sendo a determinação da essencialidade dos minerais, os quais desempenham funções fundamentais na dieta humana, sendo integrantes de diversos hormônios e de uma variedade de enzimas, intervindo concomitantemente na regulação da atividade nervosa e muscular [1,3,4].

Além da carne in natura, dados atuais mostram um crescimento do mercado de produtos processados à base de carne, já que a produção de alimentos de fácil preparo para o consumo humano se faz cada vez mais necessária, o que está diretamente relacionado com o ritmo acelerado da vida cotidiana, fazendo com que as pessoas disponibilizem de um menor tempo para se alimentar. Entretanto, no decorrer do processamento industrial podem ocorrer perdas e/ou ganhos de vários elementos essenciais, alterando o valor nutricional do alimento e, conseqüentemente, diminuindo a disponibilidade desses para o organismo, podendo afetar a saúde humana [5].

Um dos métodos mais utilizados, em produtos processados, para conservação de carnes e outros alimentos é a adição de sal (NaCl - cloreto de sódio), visto que este atua diretamente na minimização da ação de agentes naturais (enzimas ou micro-organismos) que podem deteriorar o alimento, aumentando a vida de prateleira dos mesmos. Além disso, em produtos cárneos outras funções também são alcançadas na presença deste

aditivo, podendo-se fixar a cor, com objetivo de manter ou aumentar a qualidade dessa característica sensorial, e principalmente aguçar o paladar [6].

Recentemente, Webster e colaboradores [7] apresentaram um estudo mostrando algumas iniciativas que vêm sendo feitas por alguns países para redução da adição de NaCl nos alimentos, já que essa problemática vem sendo foco de preocupações, uma vez que quantidades excessivas de Na nos alimentos tem sido associadas ao desenvolvimento de hipertensão arterial, que por sua vez, aumenta a possibilidade de doenças cardiovasculares e a morte prematura dos indivíduos. Em contrapeso, o K atua como um fator fundamental na regulação da pressão sanguínea; deste modo, sabe-se que o ideal seria encontrar quantidades semelhantes de Na e K nos alimentos [8-9].

Assim, o controle de metais em alimentos derivados de carne é de suma importância tanto para garantir a qualidade nutricional como toxicológica destes produtos. Para tanto, se faz necessário o desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos que sejam rápidos, sensíveis e confiáveis, principalmente no que diz respeito à etapa de abertura da amostra, uma vez que os métodos convencionais de análise são em sua maioria lentos, e mais propensos a contaminações. Além disso, devido à grande quantidade de reagentes necessários e a necessidade do uso de reagentes de alta pureza, estes procedimentos se tornam também dispendiosos [10]. Sendo assim, o desenvolvimento de um método analítico em micro escala para o preparo de amostras, proposta inserida no presente trabalho, se torna uma alternativa interessante e viável, pois é feita em um tempo consideravelmente menor, além de utilizar quantidades mínimas de amostras e reagentes.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e a validação de metodologias alternativas de preparo de amostras de carnes para a determinação de Na, K, Mg e Zn, buscando diminuir consideravelmente as quantidades de reagentes utilizadas durante esta etapa, aliado a mínima manipulação destas amostras e o tempo de análise. A proposta aborda a realização de micro digestões e micro solubilizações das amostras de carnes para subsequente análise por Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carne: Demanda, Exportações e Importância como alimento

O setor pecuário vem apresentando um papel de destaque na economia nacional e isto se deve ao fato de o país ser reconhecido, mundialmente, como o segundo em tamanho de rebanho bovino e em produção de carne, sendo antecedido apenas pela Índia e Estados Unidos, respectivamente [1].

Além disso, desde 2005 o Brasil vem se mantendo em primeiro lugar no ranking mundial de países exportadores de carnes, o que está diretamente associado ao baixo custo de produção da carne bovina e seus subprodutos, já que quando comparado aos principais países concorrentes, o Brasil se beneficia, pois dispõe de condições ambientais favoráveis e disponibiliza de terras a preços menores, o que reflete diretamente no preço do gado, tornando assim, o país extremamente competitivo no cenário internacional, onde a carne brasileira chega a custar um terço da produzida na Europa. Outro fator interessante, que faz com que o país se sobressaia frente aos principais produtores mundiais de carne bovina, destacando os Estados Unidos e os países pertencentes à União Europeia, é a criação extensiva e a qualidade do produto final, sendo que este último atributo se deve principalmente à alimentação do gado brasileiro, que se constitui de pastagem e/ou ração de origem vegetal. Adicionalmente, a carne bovina brasileira é isenta de hormônios de crescimento, os quais são utilizados na criação do gado em alguns países, comprometendo a qualidade do produto final, o que conseqüentemente, poderá afetar a saúde dos consumidores [1,2,11,12].

No entanto, mesmo o Brasil apresentando esse papel de destaque no mercado internacional, muitas barreiras estão sendo impostas pelo mercado externo com o intuito de tentar impedir ou dificultar essa grande demanda de importação dos produtos brasileiros, com a finalidade de proteger seus produtores locais, seja por subsídios agrícolas ou por barreiras sanitárias e tecnológicas [13]. Em função desta problemática, recentemente, um dos maiores importadores da carne brasileira, a União Europeia, suspendeu as importações do produto brasileiro in natura, declarando o não cumprimento das exigências sanitárias, às quais foram aderidas espontaneamente pelo Brasil no ano de 2000. Além disso, foi constatado também que vários frigoríficos brasileiros ainda não estavam preparados para atender as exigências do mercado exterior, acarretando assim,

perdas consideráveis, estimando-se um prejuízo de aproximadamente 30 % nos lucros relacionados às exportações. Atualmente, com base nestas regulamentações, fiscalizações estão sendo periodicamente realizadas nos produtos a base de carnes destinados a exportação pelos órgãos fiscalizadores, de modo a garantir a qualidade do produto final [14].

A comunidade Europeia criou recentemente uma comissão de normatização que regula cláusulas que apresentam os níveis toleráveis de contaminantes (orgânicos e inorgânicos) em alimentos que serão importados e comercializados, bem como estabelece algumas normas referente ao desenvolvimento e desempenho dos métodos analíticos utilizados para detectar esses contaminantes e a interpretação de resultados. Essas publicações também vêm sendo adotadas no Brasil pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), órgão regulamentador do país, tendo em vista que essas fiscalizações possibilitam assegurar a qualidade dos resultados e a validação de métodos analíticos, tornando estes confiáveis e seguros [13, 15]. Dessa maneira, fica evidente cada vez mais a necessidade de criar e validar métodos para determinações de metais e contaminantes, em geral, nos produtos alimentícios destinados a exportação para o mercado europeu e expandir esses métodos para outros órgãos fiscalizadores, podendo assim, certificar a qualidade desses alimentos.

As carnes de uma forma geral apresentam-se como um alimento de grande importância na alimentação, já que são à base de muitas vitaminas lipossolúveis e de nutrientes. A carne bovina, especificamente, é um alimento de alta relevância, justamente por ser fonte de lipídios e de proteínas de alto valor biológico, sendo amplamente consumida em diferentes hierarquias sociais do Brasil, representando 41 % do consumo total de carnes [16, 17]. Embora a carne seja desprovida de fibras dietéticas, as quais são comumente encontradas em grãos, frutas e hortaliças, além de não conter quantidades representativas de carboidratos, ainda pode ser considerada um alimento de elevada densidade nutricional, pois contém concentrações relativamente altas de proteínas agregada a um baixo conteúdo calórico, ou seja, apresenta de 15 a 20 g de proteínas a cada 100 kcal de carne magra grelhada. Sendo que também constitui uma excelente fonte de lipídios essenciais, vitaminas e minerais.

Estabelecer a composição química da carne não é uma tarefa simples, pois esta pode variar amplamente, dependendo de fatores como: espécie animal estudada, raça, sexo,

idade, tipo de alimentação e zona anatômica estudada. Contudo, os componentes majoritários da carne bovina são relatados apresentando entre 74 a 76 % de água, 21 a 22 % de proteínas, 1 a 2 % de gorduras e 1 % de cinzas (minerais em sua maioria). A maioria das substâncias nitrogenadas da carne é constituída pelas proteínas, que são consideradas os componentes em maior abundância, superados somente pela água e, em alguns casos, pela gordura. A qualidade nutritiva da carne não depende apenas de sua riqueza em proteína, mas também do fato de que é um alimento de grande qualidade biológica, visto que contém todos os aminoácidos essenciais em proporções bastante similares àquelas requeridas para o desenvolvimento dos tecidos humanos. Em geral, a carne é uma excelente fonte de zinco, ferro e cobre, e proporciona quantidades significativas de fósforo, potássio, magnésio e selênio, bem como dispõe de um conteúdo de vitaminas importantes, tais como tiamina, riboflavina, vitaminas B₆ e B₁₂, sendo que a maioria dessas vitaminas permanece relativamente estável no processamento industrial ou culinário [18].

Dentre os nutrientes contidos na carne, os minerais são de suma importância para manter o organismo em perfeita atividade, isto porque se apresentam como substâncias indispensáveis ao organismo humano, promovendo desde a constituição dos ossos, dentes, músculos, sangue e células nervosas até a manutenção do equilíbrio hídrico. Entretanto, o organismo não possui o poder de ser auto-sustentável em relação aos níveis de minerais exigidos pela dieta humana, portanto é necessária uma fonte externa para suprir essas carências, a qual é adquirida pela ingestão de alimentos, sendo que os alimentos naturais são as principais fontes de minerais para o organismo, tanto os de origem vegetal como animal.

A carne bovina é uma excelente fonte de minerais, exceto de Ca, contudo, concentrações significativas destes são encontradas neste alimento. Dentre estes, destacam-se o Fe e o Zn, que estão presentes em altas quantidades, quando comparado com os demais, e também pela relevância nutricional que exercem no organismo humano [3,19].

Desta maneira, se torna imprescindível descrever alguns elementos essenciais que estão contidos nos alimentos a base de carne e que foram estudados no presente trabalho, ressaltando a importância da determinação desses, de acordo com as funções realizadas por cada um no metabolismo humano.

Zinco (Zn)

O Zn é um micronutriente essencial, porém mesmo estando em baixas concentrações exerce diversas funções no organismo humano. A essencialidade desse metal deve-se a sua incorporação a um grande número de enzimas e proteínas (metaloenzimas), que através de processos metabólicos requerem o Zn como co-fator para funcionarem. No entanto, tanto a ausência quanto a exposição excessiva a este elemento podem trazer efeitos nocivos a saúde dos seres vivos [19,20,21,22].

O homem está principalmente exposto ao Zn através da ingestão de alimentos. As principais fontes desse nutriente são os produtos marinhos, carnes, grãos, laticínios e legumes. A carne é especialmente uma boa fonte de Zn, sendo este considerado o segundo mineral de maior valor nutricional encontrado neste alimento, perdendo somente para o Ferro. Aproximadamente 300 enzimas dependem da presença de Zn para realizar reações químicas vitais, além de atuar como estabilizador de estruturas moleculares. Está envolvido nos processos de transporte, função imune e expressão da informação genética, bem como participa de reações na síntese ou degradação de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Além dessas funções exerce papel importante no crescimento, na resposta imune do organismo, na função neurológica e na reprodução dos indivíduos [19,20].

A ingestão média diária de Zn através da dieta no país varia entre 5,2 - 16,2 mg. As taxas de ingestão aconselhadas desse nutriente na dieta diária em adultos são de aproximadamente de 15 mg para os homens e de 12 mg para as mulheres, sendo que os níveis de Zn que produzem efeitos nocivos à saúde são muito maiores que os valores máximos recomendados. Vários são os alimentos que podem conter teores de Zn variando na faixa entre 2 ppm (folhas vegetais) a 29 ppm (carnes, peixes, aves). Um déficit desse mineral poderá vir acarretar diversos efeitos, como por exemplo, atrasos na maturidade sexual, falhas no crescimento e imunodeficiências. Outras lesões, mais leves, porém negativas, também são relatadas como perda de apetite, diarreia crônica e dermatites. Por outro lado, o excesso desse nutriente pode ocasionar febre, anemia e distúrbios no sistema nervoso central [19,20].

A carne, em geral, apresenta o Fe e o Zn como os minerais de maior importância na sua composição, devido à forma que estes se encontram disponíveis. No

entanto, concentrações significativas de outros minerais essenciais recomendáveis para uma dieta saudável, como o Na, K e Mg, também são encontradas [3,20].

Magnésio (Mg)

O Mg é o segundo cátion intracelular mais importante, ficando atrás somente do K, e mesmo não estando presente no organismo em grande abundância como os macro elementos (Na, K, Ca) é um mineral essencial, pois participa de várias reações celulares, sendo indispensável para as atividades anabólicas e catabólicas. Aproximadamente 300 sistemas enzimáticos são dependentes da presença e da ação do Mg. Dentre algumas destas atividades incluem a glicólise, o metabolismo proteico e lipídico. Exerce uma função fundamental estabilizando a estrutura de ATP (Adenosina Trifosfato) no músculo e em vários tecidos moles, sendo constituinte essencial dos ossos e dentes, membrana celular e cromossomos. Intervém, igualmente, na duplicação dos ácidos nucleicos, na excitabilidade neural, e na transmissão de influxo nervoso (atuando nas trocas iônicas da membrana celular) [20,21,22].

A homeostase do Mg depende da quantidade ingerida, da absorção intestinal, excreção intestinal e renal. Apenas cerca de 1/3 do magnésio consumido é absorvido. As melhores fontes de Mg estão nos vegetais, como as verduras e legumes verdes, alguns cereais integrais e oleaginosas, porém a carne e o leite são considerados como fontes intermediárias desse mineral, enquanto os alimentos refinados apresentam níveis baixos do mesmo. As quantidades necessárias de Mg a serem ingeridas por adultos variam muito, contudo os valores indicados para o consumo diário por homens e mulheres, na faixa etária entre 19 a 30 anos, são de aproximadamente 400 mg e 310 mg, respectivamente. Após os 30 anos, é recomendado o consumo de aproximadamente 420 mg de Mg para os homens e 320 mg para as mulheres [20,21,23].

Algumas condições bruscas de deficiência de Mg podem afetar os tecidos cardiovasculares, renais e neuromusculares. A deficiência desse mineral pode ocasionar hiperexcitação neuromuscular, proporcionando a ocorrência de um círculo vicioso, o qual um déficit de Mg acarreta na diminuição da atividade neuromuscular e aumenta a sensibilidade ao stress, que por sua vez aumenta a possibilidade de perdas magnesianas. Estas depleções acentuadas de Mg originam processos metabólicos complexos,

desregulando o sistema nervoso e endócrino, que está diretamente relacionado ao stress agudo ou crônico. Podem ser observadas em casos de má absorção, alterações no sistema renal, alcoolismo e de desnutrição proteico-calórica. Todavia, não há evidências de efeitos adversos em casos da ingestão em excesso de Mg, se esse for provido a partir da ingestão de alimentos naturais; porém efeitos adversos foram evidenciados em casos da utilização de suplementos alimentares, o qual ocasiona diarreia osmótica [20,22].

Sódio (Na)

O Na é um metal de origem mineral, que juntamente com o cloro (Cl) forma o cloreto de sódio (NaCl), comumente conhecido como o sal de cozinha. O Na é considerado um dos 22 minerais essenciais para a saúde humana e apresenta-se como o principal cátion dos líquidos extracelulares do corpo, constituindo 2 % do conteúdo mineral total do organismo e 0,15 % do peso corporal total, contribuindo para regulação do equilíbrio hídrico e ácido/básico do organismo. Desempenha um papel importante no mecanismo de transporte de moléculas através das membranas celulares, exercendo atividades vitais, participando da absorção de aminoácidos, glicose e água [20,24].

Este mineral é encontrado em praticamente todos os alimentos na forma de sais, como exemplo o NaCl, mais utilizado e já citado, mas também pode ser encontrado na forma de outros sais minerais, como iodetos, nitritos e etc. Os alimentos de origem vegetal são conhecidos como fontes pobres de Na. Nas frutas sua presença é praticamente nula, sendo que concentrações escassas são contidas em leguminosas e cereais, entretanto, quantidades mais elevadas são encontradas em folhas como espinafres e hortaliças. Já para os alimentos de origem animal, as concentrações de Na são mais abundantes, sendo principalmente encontrado em produtos cárneos, derivados de laticínios, ovos, entre outros [22].

As necessidades de sódio na dieta são mínimas e amplamente supridas pela alimentação. Atualmente, dados obtidos em estudos mostram que, em média são consumidos 9,6 g de Na (NaCl) por dia pela população brasileira, representando quase o dobro do limite máximo recomendado pela OMS (Organização Mundial de Saúde), que fixa em no máximo 5 g o consumo diário de sal [25,26].

A ingestão excessiva de Na implica em vários malefícios à saúde humana, o fato mais relatado é a relação entre o consumo de sal e a hipertensão arterial (doença que afeta

25 % dos brasileiros) e, acarreta outras doenças cardíacas, tendo em vista que a maioria dos alimentos processados industriais, os quais estão sendo consumidos em demasia atualmente, apresentam concentrações desproporcionais de Na e K, provocando um distúrbio no equilíbrio hídrico do organismo, alterando conseqüentemente outras atividades vitais. Além disso, o excesso de Na afeta o sistema renal e induz a doenças crônicas, bem como interfere na absorção e no metabolismo do cálcio, podendo ter impacto negativo na saúde óssea. O déficit de Na é raramente encontrado, porém quando ocorre uma grande retenção de líquido ou de uma dieta pobre em sal, estas condições levam a baixos níveis de Na, definida como Hiponatremia, cujos sintomas incluem dores de cabeça, náuseas, vômitos, desorientação e fadiga [20,24,26].

Potássio (K)

O K é o principal cátion intracelular, que contribui para o metabolismo e síntese das proteínas e glicogênio, constituindo 5% da carga mineral total do corpo e exerce papel importante na excitabilidade neuromuscular e na regulação hídrica do organismo. O K, juntamente com o Na, trabalha para manter o balanceamento da água no corpo, bem como é responsável pela contração muscular, pelo funcionamento cardíaco e participa da transmissão dos impulsos nervosos [16,20].

Estudos relatam que taxas concentradas de K são mais requeridas em fase de crescimento dos indivíduos. Todavia, fora deste período, níveis mínimos são exigidos para o metabolismo humano, os quais são prontamente cobertos pela alimentação. As fontes desse nutriente em alimentos são abundantes, sendo o mineral mais importante encontrado em frutas (banana, ameixa seca e laranja), legumes e verduras, estando presente também em carnes, leite e oleaginosas [9,16,20].

O consumo diário ideal de K, em média, para adultos é de aproximadamente 4,7 g, exceto para atletas que realizam exercícios físicos pesados e rotineiramente, necessitando de concentrações diárias mais elevadas pela perda excessiva desse mineral, principalmente devido à eliminação volumosa de líquidos pela transpiração. O K é essencial para uma boa nutrição e saúde, e adquirir as concentrações mínimas exigidas é fácil, tendo em vista a variedade de alimentos que contém o mineral; porém, manter a relação recomendada de Na e K, pode ser bem mais difícil. Um aumento moderado de K

na dieta, através de suplementos, pode ser benéfico, especialmente para as pessoas com risco a hipertensão, reduzindo significativamente o excesso de sódio no organismo [9].

A relação Na/K exerce um papel essencial no mecanismo da hipertensão, pois os níveis de Na e K, através de uma diferença eletroquímica, controlam o potencial das membranas, o que está diretamente ligado a bomba de Na/K/ATPase e que, por sua vez, desempenha a importante função de manter o potencial das membranas regulado, utilizando energia para realizar a troca de Na (para fora da célula) e K (para dentro da célula). Dessa maneira, o bom funcionamento dessa bomba e do sistema se faz necessário para a transmissão do impulso nervoso, contração muscular e funcionamento do coração. A deficiência de K (hipocalemia) pode ocorrer pelo baixo consumo de frutas e hortaliças, ou decorrer de uma perda excessiva do mineral, como é evidenciado em casos de vômitos e diarreias, sem reposição adequada. Há também o fato do uso excessivo de medicamentos, como os diuréticos e laxantes. De todas as formas, um déficit de K no organismo pode levar o indivíduo a apresentar sintomas de fadiga, fraqueza muscular, câimbras e paralisia intestinal, sendo que em caso de hipocalemia severa, acarreta a arritmia cardíaca, podendo ser fatal [16,20,24].

3.2 Influência do Processamento Industrial nas Carnes.

Um dos principais problemas encontrados pela indústria alimentícia está na conservação de seus produtos, que visa o aumento da vida de prateleira dos mesmos e reduzir as alterações nas características sensoriais dos alimentos. Entretanto, para tal preservação, se faz necessário à utilização de conservantes, que pode ser através da adição de aditivos ou utilização de processos físicos, como por exemplo, a refrigeração, congelamento, aquecimento e irradiação, ou ainda utilizar processos biológicos, como a fermentação, os quais sempre, de alguma forma, podem afetar determinadas características, alterando até mesmo a biodisponibilidade de vários nutrientes no alimento [5,27].

3.2.1 Perdas e Ganhos de nutrientes em carnes pelos processos industriais.

Geralmente, as técnicas utilizadas para a conservação de um alimento baseiam-se, predominantemente, na diminuição das atividades microbianas que deterioram o alimento. Alguns métodos de conservação se baseiam na completa inativação de microrganismos

(uso de calor e radiação ionizante), entretanto, outros métodos agem apenas no controle do crescimento desses invasores, como é o caso utilizado nas fermentações e outros métodos que controlam o pH, temperatura ou atividade da água [27].

No momento de escolher o melhor tratamento a ser destinado a um alimento de forma geral, vários pontos críticos devem ser avaliados, como o pH do meio e a atividade da água do produto, tendo em vista que, alimentos com pH alto e elevada atividade de água são considerados mais suscetíveis a ataques de microrganismos e portanto de fácil deterioração. Um dos fatores mais importantes na avaliação dos aspectos que ocasionam alterações em alimentos é o parâmetro da temperatura. A utilização de calor para conservar alimentos tem o foco de diminuir a concentração microbiana e fazer a desnaturação enzimática. Tratamentos térmicos de diferentes naturezas podem ser aplicados, tanto o uso de aumento de temperatura, para inativar os microrganismos, quanto a utilização de baixas temperaturas, as quais são responsáveis por uma diminuição no crescimento microbiano e a velocidade das reações químicas [27].

A técnica de refrigeração consiste em estocar um produto a temperaturas entre 0°C e 7°C [28]. Este processo não possui ação esterilizante, apenas retarda as atividades microbianas já existentes. Embora o método de refrigeração proporcione uma maior conservação das características químicas e organolépticas da carne, ele é responsável por alguns efeitos adversos sobre as propriedades sensoriais do produto, o que faz com que cuidados sejam necessários durante esta etapa [27].

O congelamento por sua vez, aplica temperaturas mais baixas do que a refrigeração (-18°C ou inferiores), prolongando o tempo de conservação da carne. As temperaturas utilizadas reduzem ou paralisam os danos provocados por microrganismos, enzimas ou agentes químicos. Em contrapartida ao método de refrigeração, o congelamento é um dos melhores métodos para manter a cor, o aroma e a aparência do alimento, o que faz com que este método de conservação tenha uma maior aplicabilidade, quando comparado aos demais [27].

De acordo com Andrade e colaboradores [28], os processos de conservação baseados no princípio de refrigeração e ou congelamento, bem como processamentos térmicos, podem alterar fisicamente as carnes provocando transformações nos teores de nutrientes. O estudo evidenciou que ocorreram perdas consideráveis de Zn e Cu em amostras de

carnes, as quais foram submetidas a processos de cocção e posterior congelamento. Foi constatado que no decorrer de cada semana de congelamento das amostras, as concentrações de ambos os elementos citados, foram decrescendo, evidenciando as perdas nutricionais ocasionadas pelo processo de preservação utilizado. Segundo os autores, estas perdas associadas à técnica de congelamento se devem principalmente pelo fato que no momento do descongelamento das carnes, ocorrem perdas através do gotejamento da água formada, e como não ocorre a reabsorção total do suco da carne, alterações nas concentrações desses minerais e o valor nutricional do alimento são uma consequência. Assim sendo, o recomendado é utilizar as carnes mais frescas possíveis, isto é, carnes resfriadas ou congeladas por períodos de no máximo uma semana.

3.2.2 Adição e ação de conservantes à base de Na em produtos cárneos.

Um conservante é definido como toda a substância que impede ou retarda a ação de microrganismos ou enzimas que provocam alterações em alimentos. Para evitar riscos de perda demasiada de alimentos, o uso de conservantes ou de agentes antimicrobianos se faz imprescindível, visto que, dependendo do alimento, nem sempre poderão ser aplicados processos físicos que envolva calor ou frio. Muitos dos conservantes, tais como sulfitos, nitratos e outros sais, já são usados há séculos para conservar carnes processadas e vinhos. Atualmente, o uso desses conservantes está em uma demanda ascendente, pois cada vez mais o mercado se preocupa em apresentar uma variedade maior de alimentos processados, de fácil preparo e consumo, bem como em atender as exigências das cadeias de distribuição, que requerem um aumento na vida de prateleira (*shelf life*) dos produtos industrializados [27,29].

Dessa maneira, a adição de conservantes nos alimentos processados se torna cada vez mais necessária. No entanto, estes devem ser escolhidos levando em consideração vários fatores, tais como: tipo de microrganismo a ser inibido, facilidade de manuseio, impacto no paladar, custo e sua eficácia. Dentre os conservantes mais conhecidos e utilizados atualmente em carnes e produtos processados cárneos, está o ácido benzóico e seus sais derivados, os parabenos ou ésteres de PHB, os sulfitos, nitratos e nitritos, cloreto de sódio, ácido sórbico e derivados; estes citados e tantos outros podem ser consultados na portaria nº1004, de 11 de dezembro de 1998, regulamentada e fiscalizada

pela Anvisa, que estipula quais os conservantes podem ser adicionados a esses produtos, bem como fixa os valores máximos permitidos adicionados [27].

O cloreto de sódio (NaCl), ou mais comumente conhecido por sal de cozinha, tem se apresentado a séculos como um ingrediente versátil, tanto na conservação quanto na utilização como tempero, aguçando o paladar dos alimentos. A atividade antimicrobiana do sal é dada pela inibição do crescimento de microrganismos (bactérias e fungos) através da perda osmótica da água, a qual influencia diretamente no crescimento desses agentes deteriorantes. Além disso, o sal afeta outras características importantes além desse efeito osmótico, como exemplo, diminui a solubilidade do oxigênio, modifica o pH e, facilita a perda de íons Mg. Porém, as quantidades de NaCl a ser adicionadas também devem ser limitadas, pois concentrações excessivas em determinados alimentos podem alterar significativamente as características sensoriais do alimento, principalmente ao que se refere ao sabor contido nos mesmos [8,20,27,30].

Todavia, muitos estudos na literatura retratam a importância de se reduzir as quantidades de sal adicionadas nos alimentos, pois a ingestão excessiva de Na está diretamente relacionada ao desenvolvimento de hipertensão, o que por sua vez acarreta diversas doenças cardiovasculares [7,8,27,30]. Webster e colaboradores [7], em recente pesquisa, relataram que vários países estão investindo em novas estratégias que visam à redução da adição de Na nos produtos industrializados. Porém, as indústrias vêm demonstrando um pouco de oposição, pois muitas alterações na qualidade do produto podem ocorrer, influenciando diretamente no desenvolvimento econômico. Neste contexto, recentemente muitas pesquisas vêm sendo feitas em busca do uso de aditivos conservantes alternativos, com o intuito de diminuir de forma expressiva a adição do NaCl no alimento processado[8,29-32].

De acordo com Ruusunen e Puolanne [8], a substituição de sais de Na por sais de Mg ou K, proporciona um gosto amargo nos alimentos. Contudo, muitas misturas de sais, em diferentes concentrações, foram testadas. De acordo com os autores, este estudo propiciou uma considerável diminuição na concentração de Na nos produtos à base de carne analisados, o que por sua vez, irá minimizar os riscos do desenvolvimento de doenças cardiovasculares associados ao consumo destes. Entretanto, uma desvantagem foi constatada: os consumidores desses alimentos conservados na presença dessas misturas de sais não se adaptaram às mudanças do paladar, mostrando assim uma forte

aversão a esses produtos, o que segundo os autores evidencia a importância de novos estudos.

3.3 Técnicas de Espectrometria Atômica para determinação de metais.

As técnicas de espectrometria atômica utilizam a radiação eletromagnética que é absorvida ou emitida pelos átomos no estado gasoso, os quais são formados durante a etapa mais importante desses métodos que é denominada de Atomização. Através destes princípios, a obtenção de informações das amostras em estudo, tanto em caráter qualitativo, quanto quantitativo, é alcançada, podendo determinar concentrações a nível de ppm, ppb ou até mesmo de quantidades menores (nível-traço). A técnica de Espectrometria Atômica é amplamente utilizada para detecção de mais de 70 elementos da tabela periódica, sendo uma poderosa ferramenta para o controle de metais em amostras de diferentes naturezas, já que, apresenta-se como uma técnica seletiva, versátil, rápida e que possui sensibilidade adequada [33,34].

3.3.1 Técnica de Espectrometria de Emissão Atômica (AES).

A espectrometria atômica teve papel essencial no desenvolvimento da química como um todo, mas principalmente influenciou muito na propagação da química analítica. A história teve início em aproximadamente 1648, com os experimentos de Joannes Marci, que estudou a origem da formação das linhas do arco-íris, através de suas observações com base no espalhamento da luz solar nas gotículas de água. Posteriormente, em 1672, Isaac Newton relatou a decomposição e recomposição da luz solar através de um prisma. A partir daí, vários experimentos foram desenvolvidos, utilizando como objeto de estudo o espectro procedente da decomposição da luz solar e, esses estudos designaram a descoberta das variadas faixas do espectro eletromagnético, podendo citar a região do ultravioleta, descoberta no ano de 1801, pelo alemão Johann Ritter, juntamente com o inglês William Wollaston.

Em 1814, Wollaston e Fraunhofer evidenciaram a existência de raios visíveis na luz solar, inclusive as linhas escuras no espectro obtido através da luz do sol, as quais foram melhor explicadas por Brewster em 1820, esclarecendo que essas raios visíveis eram decorrentes do processo de absorção de vapores presentes na atmosfera. Anos se passaram e, em 1859, o químico Robert Bunsen e o físico Gustav Kirchhoff criaram um

espectroscópio que lhes permitiu a visualização de linhas de emissão de elementos químicos, os quais foram excitados pelo calor de uma chama não luminosa (queimador de bunsen) e, dessa maneira foram descobertos dois novos elementos, o Césio e o Rubídio [33,35].

Dessa forma, com base nestes experimentos, alguns conceitos foram formulados a partir dos fenômenos visualizados no espectroscópio da chama de Bunsen e Kirchhoff, o qual se averigua que os átomos ou as moléculas excitados a altos níveis de energia, podem cair a níveis menores e assim, podem emitir radiação característica para cada elemento.

Com base neste princípio, surge a técnica de Espectrometria de Emissão Atômica (AES), que utiliza a medição quantitativa da emissão óptica de átomos neutros excitados para determinar as concentrações das substâncias de interesse, isto é, os átomos do analito de interesse contidos em forma de solução, são aspirados na região de excitação, onde serão dissolvidos, vaporizados e atomizados por uma chama, descarga ou plasma e, estas fontes de atomização fornecem energia suficiente para promover os átomos a altos níveis de energia, os quais ao retornarem ao seu estado fundamental, liberam energia na forma de radiação eletromagnética, sendo essa intensidade de energia diretamente proporcional a concentração de átomos de determinado elemento [34,36].

Um espectrômetro de emissão atômica é composto basicamente de um atomizador, como já citado anteriormente, podendo ser uma chama, descarga (corrente elétrica) ou plasma, também sendo necessário um sistema óptico (filtro/monocromador) e um detector, sendo que o mais comumente utilizado são os monocromadores, com a função de selecionar os comprimentos de ondas específicos de cada elemento a ser determinado e um detector aliado a fotomultiplicadoras e amplificadores para registrar o sinal radiante de uma forma apropriada. Na Figura 1 é demonstrada a instrumentação básica de um Espectrômetro de Emissão Atômica com chama (Fotômetro de Chama – F AES).

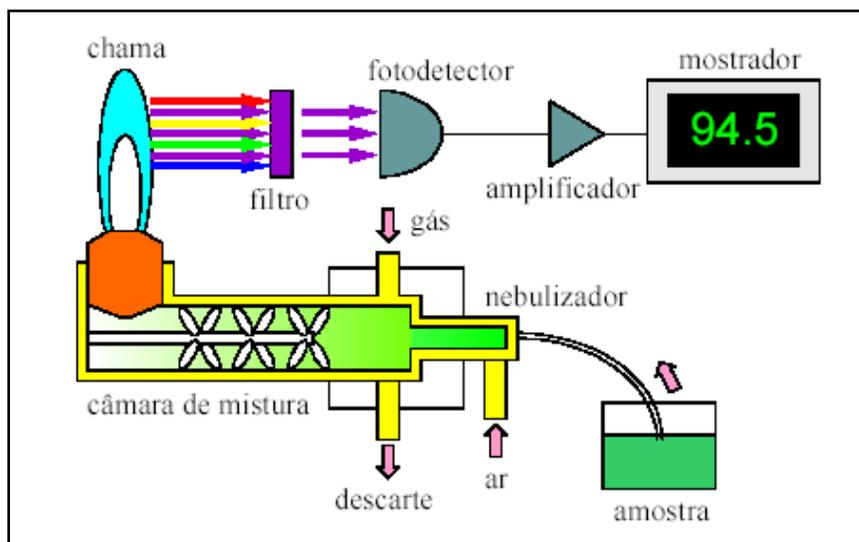


Figura 1 – Principais componentes de um Fotômetro de chama convencional.

A Fotometria de chama é considerada a mais simples das técnicas analíticas fundamentadas em espectrometria atômica, pois se baseia na excitação de átomos neutros através da introdução da amostra em uma chama. A escolha da mistura gasosa a ser usada é importante, pois vai proporcionar temperaturas mais baixas ou mais elevadas, refletindo diretamente na excitação dos átomos. Nos fotômetros de chama convencional, por exemplo, o ar comprimido é utilizado como oxidante e o gás butano (GLP) é usado como combustível e, dessa forma a chama opera em temperatura entre 1.700 e 1.900 °C. No entanto, quando se utiliza a chama de ar- acetileno, a temperatura pode ficar em torno de 2.100 a 2.400 °C no F AAS operando no modo de emissão.

A técnica de F AES, utilizando ar/GLP, como opera com o fotômetro, proporciona temperaturas baixas, porém o suficiente para excitar elementos como Na, K, Li e Ca, sendo esta uma importante limitação, pois restringe a técnica para determinação de apenas quatro elementos. Entretanto, a energia fornecida já é suficiente para proporcionar a emissão das linhas atômicas características para estes elementos, sendo que a intensidade de cada linha gerada depende diretamente da concentração da espécie excitada e da probabilidade de ocorrer à transação eletrônica. Na Tabela 1 são apresentadas as principais propriedades das chamas mais utilizadas em emissão e absorção atômica [33,34].

Tabela 1 – Propriedades das chamas comumente empregadas em F AES e F AAS.

Mistura gasosa combustível/Oxidante	Temperatura °C	Máxima velocidade de queima (cm.s ⁻¹)
Gás natural/Ar	1.700 – 1.900	39 – 43
Gás natural/O ₂	2.700 – 2.800	370 – 390
H ₂ /Ar	2.000 – 2.100	300 – 440
H ₂ /O ₂	2.500 – 2.700	900 – 1.400
Acetileno/Ar	2.100 – 2.400	158 – 266
Acetileno/O ₂	3.050 – 3.150	1.100 – 2.480
Acetileno/N ₂ O	2.600 – 2.800	160 – 285

Diante a essas possíveis combinações de gases combustíveis e oxidantes, algumas otimizações são necessárias, como por exemplo, a razão utilizada na mistura gasosa, a qual tem por objetivo buscar uma chama com a maior estabilidade possível, com temperatura constante e uniforme, pois variações nas proporções desses gases podem influenciar no equilíbrio da chama e, assim pode afetar a eficiência de atomização. Outro ponto importante que deve ser destacado e ajustado é a altura do queimador, pois a chama apresenta regiões de maior estabilidade e à medida que se distancia da base do queimador, a chama muda em forma, temperatura e composição. Tendo em vista a limitação do curto tempo de vida de átomos livres formados, se faz necessário otimizar a altura da chama, buscando definir a melhor região de passagem da radiação, e para isso se torna necessário também um controle da vazão dos gases, pois essa proporção pode afetar significativamente a estabilidade da chama e conseqüentemente alterar a eficiência no processo de atomização [34].

A escolha da mistura gasosa a ser utilizada também pode ser dependente do elemento a ser determinado, bem como pela matriz da amostra. Alguns elementos têm dificuldade para volatilizar, necessitando então de temperaturas mais elevadas, como por exemplo, as temperaturas proporcionadas através da mistura acetileno/N₂O, que além de proporcionar uma chama mais quente, são capazes de reduzir a presença de compostos interferentes (óxidos), no entanto, temperaturas mais altas podem acarretar em interferências de ionização, isto se sucede pelo fato que a energia disponibilizada é tão

alta que ultrapassa o processo de atomização, favorecendo a formação de íons, e que por sua vez, diminui a quantidade de átomos no feixe óptico, afetando a etapa de absorção e emissão das espécies [33,34].

O sistema de introdução da amostra usando a chama como atomizador se faz principalmente via nebulizadores pneumáticos, que agem de forma a conduzir a amostra através de um fluxo de gás comprimido. A amostra contendo o analito de interesse é aspirada até o nebulizador, onde ocorre a formação de um aerossol fino, contendo micro gotículas do analito a ser determinado e, essa névoa é arrastada pela mistura gasosa até a chama, onde ocorre, dentre outros, o processo de excitação dos átomos. Os fenômenos físicos e químicos, que transcorrem na chama, desde a formação do átomo no estado gasoso e fundamental, estão ilustrados na Figura 2 [36].

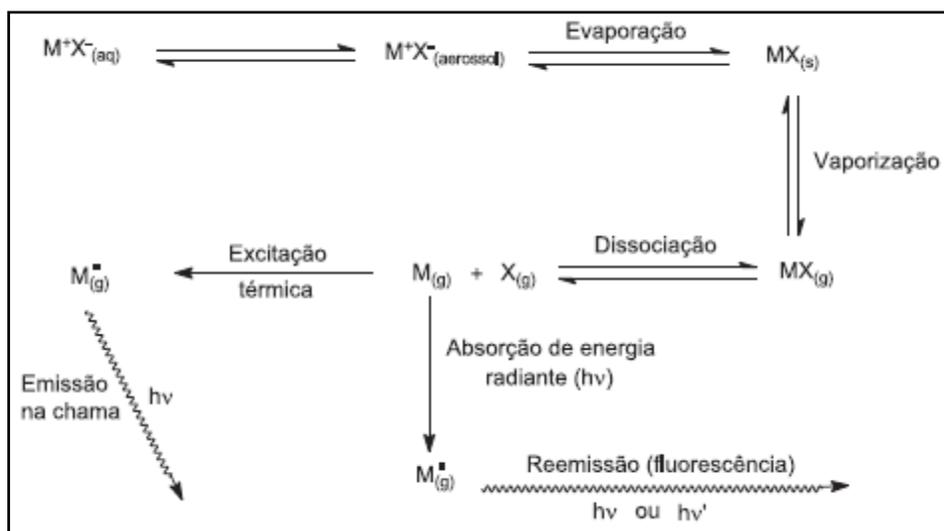


Figura 2 – Esquema das reações físicas e químicas que ocorrem na chama.

É aconselhável que o aerossol da amostra formado contenha partículas inferiores a 5 – 10 μm para aumentar a eficiência da atomização das espécies. A primeira etapa da formação deste é chamada dessolvatação, a qual é responsável pela eliminação do solvente por evaporação, dividindo as pequenas gotas em partículas sólidas bem finas. Após esse processo, as partículas sofrem a volatilização, havendo a formação de moléculas gasosas que, na presença da alta temperatura da chama, são dissociadas a átomos. Em alguns casos, os átomos presentes no gás se ionizam formando cátions e

elétrons, mas há também a incidência de outras espécies, resultantes de interações da mistura gasosa ou da matriz da amostra.

A utilização de nebulizadores pneumáticos para introdução da amostra na chama são os mais empregados, sendo considerados muito eficientes, porém apenas 5 – 10% da solução da amostra é introduzida na chama, sendo sua maior parte descartada pelo dreno, o que afeta diretamente a sensibilidade dos resultados obtidos [36,37].

Existem basicamente dois tipos de interferências relacionadas com as técnicas de espectrometria atômica: as interferências espectrais e não espectrais. As interferências espectrais acontecem quando a emissão ou absorção de uma espécie indesejada se sobrepõe ou fica muito próxima da emissão ou absorção da linha do analito, limitando a atuação do monocromador para separar essas linhas de radiação. Já as interferências não-espectrais geralmente são decorrentes de vários processos que ocorrem durante a etapa de atomização, variando de forma representativa a população de átomos na cela de absorção.

Como já citado anteriormente, um exemplo muito evidenciado de interferência não-espectral são as interferências de ionização, as quais ocorrem pelas altas temperaturas de algumas chamas que, dependendo do analito a ser determinado, essa alta energia ultrapassa a etapa de atomização, resultando na dissociação de íons e, que por vez, reduz a quantidade de átomos no estado fundamental, o que acaba por diminuir a absorvância das espécies. Metais alcalinos e alcalinos terrosos são os mais suscetíveis a essas interferências, como o Na quanto K, pois apresentam baixos potenciais de ionização, ou seja, se ionizam com maior facilidade quando comparados a outros elementos. O método mais comum de ser aplicado para minimizar os efeitos dessas interferências é o uso de soluções tampão (tampões de ionização), sendo estas padrões de um sal (Cloreto de cézio, lantânio, lítio), contendo um elemento com menor potencial de ionização que a espécie a ser determinada[33,34,37,38].

A Fotometria em chama é uma técnica amplamente utilizada no controle de qualidade de alimentos, principalmente quantificando metais alcalinos e alcalinos terrosos, além disso, o método é de fácil manuseio, necessitando de poucos recursos para a decorrência das análises, apresentando resultados bastante sensíveis e confiáveis.

3.3.2 Técnica de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS).

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) surgiu em meados de 1955 através de Alan Walsh, considerado o “pai” da técnica e, mesmo hoje, depois de passados 60 anos da criação da técnica, o método continua bem consolidado, sendo utilizado em numerosos campos da análise instrumental, isto se deve a sua alta especificidade e seletividade, bem como ao fato da simplicidade de operação, podendo assim ser utilizado em análises de rotina. Além disso, Walsh também é reconhecido pela sua grande contribuição nos estudos que resultaram na criação das lâmpadas de cátodo oco, sendo estas as principais fontes de radiação empregadas na técnica de absorção atômica [33].

Apesar de ser uma técnica monoelementar, a AAS é considerada uma técnica analítica bem sucedida, já que é muito utilizada para determinações de elementos que se encontram a nível traço, podendo ser aplicada em diversas matrizes, sejam elas líquidas, sólidas, suspensões ou até mesmo em amostras gasosas, proporcionando também análises de especiação química, quando associada a outros sistemas em fluxo. Além disso, estudos novos vêm sendo realizados a fim de melhorar os limites de detecção, principalmente no que se referem a meios alternativos de introdução de amostras, fontes de radiação de alta intensidade e melhores sistemas de leituras e tratamento dos dados analíticos [33,39].

Pode-se dizer que a técnica de AA passou a existir aproximadamente 60 anos atrás, quando Walsh estabeleceu os fundamentos teóricos e instrumentais da técnica, baseando-se no princípio de Kirchoff que dizia: “Qualquer material que pode emitir radiação em um determinado λ , também irá absorver radiação daquele mesmo λ ”. E, com base nesse princípio fundamental, a técnica é descrita pela capacidade dos átomos (estado fundamental e gasoso) em absorver a energia emitida em comprimentos de onda específicos, provinda de uma fonte de radiação primária, assim a transição de elétrons, principalmente os da camada de valência, sofrem os processos de excitados para um nível mais energético e, após permanecerem por um curto espaço de tempo no estado excitado, retornam ao estado fundamental, emitindo os fótons absorvidos [33,37,39]. Em condições ideais, a quantidade de radiação absorvida está diretamente relacionada com a concentração de átomos no estado inicial e, isto pode ser melhor demonstrado através da equação de Planck:

$$\varepsilon = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Equação 1

Onde: ε é a energia responsável pela transição eletrônica do átomo no estado fundamental para o estado excitado, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda.

Como cada espécie atômica só pode existir em alguns estados excitados específicos, as energias absorvidas serão específicas para cada espécie, isto é, cada átomo elementar irá absorver radiações com frequências (λ) específicas. Contudo, a grandeza do sinal de absorção está relacionada diretamente ao número de átomos no estado fundamental presentes no feixe óptico do espectrômetro. Na equação de Boltzmann (Equação 2) esse fato fica mais claro, a qual apresenta a relação entre os átomos no estado fundamental e no estado excitado, em função da temperatura fornecida pela cela de atomização [33].

$$N_1 / N_0 = (g_1 / g_0) e^{-E/kT}$$

Equação 2

Onde: N_1 é o número de átomos no estado excitado, N_0 é o número de átomos no estado fundamental, g_1/g_0 é a razão dos pesos estatísticos dos estados fundamental e excitado, e é a energia específica da excitação, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta em Kelvin.

Em sequência desses princípios, chega-se a combinação das leis de Lambert e Beer, que relaciona a concentração dos átomos no estado fundamental com a absorção de radiação eletromagnética. Esta lei é reconhecidamente uma das mais importantes para AAS, sendo denominada como a Lei de Lambert-Beer, a qual está resumidamente demonstrada na equação 3 [33,37].

$$A = \log_{10} I_0/I_t = abC$$

Equação 3

Onde: A é a absorvância; I_0 é a intensidade da radiação incidente emitida pela fonte de luz; I_t é a intensidade da radiação transmitida (não absorvida); a é o coeficiente de absorção do meio ou absortividade; b é a espessura do volume de observação ou volume de absorção e C é a concentração de átomos no estado fundamental.

Um espectrômetro de absorção atômica é um instrumento analítico que possibilita a análise quantitativa de elementos metálicos em matrizes líquidas, gasosas ou sólidas. É constituído basicamente por uma fonte de radiação primária, uma cela de atomização, conjunto de monocromador, detector e processador. As fontes de radiação mais amplamente usadas são as lâmpadas de cátodo oco (LCO), porém há possibilidade de se utilizar as lâmpadas de descarga sem eletrodos (EDL). Essas fontes têm por objetivo fornecer as raias de emissão características para o elemento atômico de interesse. Os componentes básicos incluem ainda, os atomizadores, que geralmente são uma chama, um forno de grafite ou uma célula de quartzo, que realizam o processo de gerar a nuvem atômica, contendo os átomos no estado gasoso e fundamental, propícios a absorver a radiação provinda da fonte; um monocromador, para selecionar as linhas características do elemento a ser determinado; um detector (fotomultiplicadora), que transforma o sinal radiante em sinal elétrico; um amplificador, para aumentar o sinal e ainda um sistema de leitura. A Figura 3 apresenta um esquema dos principais componentes de um espectrômetro de absorção atômica, utilizando a chama como atomizador [33,34,37].

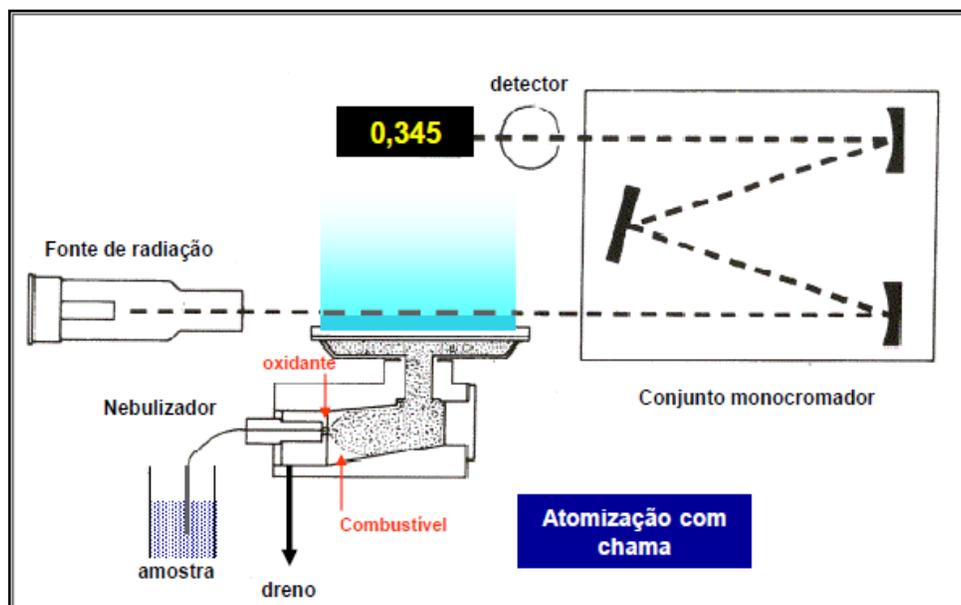


Figura 3 – Componentes básicos de um espectrômetro de AAS com chama.

Deve-se destacar que, na AAS a energia absorvida pelo átomo gasoso no estado fundamental é proveniente de uma fonte de radiação eletromagnética apropriada, e a cela de atomização tem por objetivo a transformação do elemento a ser determinado na forma adequada para ocorrer o processo de absorção. Entretanto, na AES, como por exemplo, utilizando a chama, como atomizador, essa chama tem duas finalidades, a qual a primeira é de também atomizar o analito e, o segundo objetivo está de disponibilizar a energia necessária para que o átomo se excite e alcance os níveis de maior energia [33,37].

Outra configuração que foi desenvolvida e está em grande ascensão, pois já contém inúmeros trabalhos publicados é a utilização de um espectrômetro de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), a qual permite usar apenas uma fonte de radiação que emite a frequência de praticamente todos os metais e para tanto, também oferece um sistema de detecção de alta resolução que visualiza um espectro em 3D, fornecendo imagens que ajudam a detectar possíveis interferentes espectrais e/ou de fundos estruturados, além disso, esta técnica possibilita análises multielementares ou até mesmo simultâneas, quando a janela de observação apresentar comprimentos de ondas semelhantes para os elementos em estudo [35,40,41].

O sistema de introdução de amostra utilizando aspiração/nebulização em um espectrômetro de absorção atômica é igual ao sistema de um fotômetro com chama,

porém, devido ao seu baixo rendimento e consumo relativamente alto de amostra, alternativas vem sendo estudadas e desenvolvidas para obter melhores resultados, com maior precisão e exatidão. Sistemas utilizando micro-injeções já foram desenvolvidos, os quais se baseiam em introduzir pequenos volumes de amostras diretamente no capilar do nebulizador, sendo que, esse volume reduzido, pode ser injetado manualmente via micropipeta, existem também disponíveis equipamentos comerciais com esse sistema automatizado. Esse sistema resulta em sinal transiente, podendo ser registrada tanto a altura máxima do pico quanto a área integral do pico, permitindo analisar soluções mais concentradas, as quais estariam fora da faixa linear de trabalho pela técnica usual [33].

Flores e colaboradores em diversos estudos [42-44] tornaram possível a determinação direta na chama de vários elementos em diferentes matrizes de amostras. Os resultados mostraram-se satisfatórios, porém os autores apontam a necessidade de um controle rigoroso no tamanho das partículas que estão sendo carreadas até a chama, pois além de verificarem dificuldades de transporte dessas partículas, evidenciaram também uma deficiência durante a etapa de atomização, pois partículas sólidas são mais difíceis de serem vaporizadas quando comparadas àquelas formadas a partir de soluções. Outro problema discutido pelos autores nos trabalhos foi à dificuldade na construção das curvas analíticas de calibração, as quais para que representassem melhor a matriz da amostra, foi necessária a utilização de materiais de referência com composição semelhante a das amostras, podendo desta forma visualizar possíveis interferências decorrentes da própria matriz.

É importante ainda salientar que, mesmo essas técnicas alternativas de introdução de amostras, principalmente na F AAS, venham apresentando resultados bastante eficientes em diversos trabalhos, esses métodos apenas ocupam um papel complementar até agora, com poucos equipamentos comerciais que disponibilizam destes sistemas.

3.4 Métodos convencionais de preparo de amostras e métodos alternativos.

Em uma análise química de uma forma em geral, utilizando uma determinada técnica analítica, na maioria das vezes exige um tratamento adequado da amostra visando sua preparação para a forma mais apropriada de inserção no instrumento analítico a fim de determinar os elementos de interesse. Porém, esse tratamento pode variar, desde um simples polimento da superfície da amostra, até uma completa transformação de uma amostra sólida em uma solução compatível com o método de determinação. Dessa maneira, muitos fatores devem ser avaliados quando se for decompor uma amostra, entre eles está à natureza dessa matriz, bem como o elemento e a concentração do mesmo na amostra, além do método a ser usado, associados à precisão e exatidão requeridas [45].

Dentre os métodos convencionais mais utilizados citados na literatura, para a preparação de amostras biológicas no controle de minerais por técnicas espectrométricas, com o uso de nebulização pneumática convencional, normalmente envolvem a digestão da amostra na presença de ácidos que possuem propriedades oxidantes, as quais podem ser aquecidas utilizando um bloco digestor ou por radiação microondas. No entanto, estes procedimentos convencionais apresentam algumas desvantagens, tais como: o alto consumo de tempo, o aumento do risco de contaminação e/ou perda de analito por volatilização e o elevado consumo de reagentes corrosivos e perigosos. Mas quando estes procedimentos são bem conduzidos, esses inconvenientes podem ser minimizados [45,46].

Vários métodos alternativos estão em desenvolvimento com o intuito de evitar ou minimizar esses possíveis inconvenientes, sendo que dentre os mais citados na literatura, está a análise direta de amostras sólidas, a qual oferece um ganho no tempo necessário de preparo da amostra, reduzindo significativamente os riscos de perdas dos analitos e/ou contaminação da amostra, bem como uma redução das quantidades de reagentes perigosos e dispendiosos. Estão sendo também reportados na literatura métodos alternativos de amostragem por suspensão, os quais envolvem a solubilização parcial ou completa da matriz da amostra, utilizando tanto reagentes ácidos como alcalinos [10,46-52].

O uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) tem sido relatado na preparação de amostras biológicas como uma alternativa aos procedimentos convencionais de digestão para a determinação de íons metálicos por espectrometria atômica [47-51]. Este reagente é uma base orgânica forte, solúvel em água ou álcool, com propriedades de solubilizar

diferentes tipos de tecidos, causando a dissociação das espécies químicas. As amostras biológicas solubilizadas com TMAH fornecem uma solução com características de uma suspensão, apresentando um baixo fator de diluição, sendo capaz de estabilizar os elementos por meses em temperatura ambiente, além de ser um método de preparo de amostra rápido, fácil, simples e reprodutível. A solubilização alcalina geralmente não requer nenhum sistema de aquecimento e, portanto, previne a perda de elementos voláteis antes da análise. Além disso, necessita de pequenos volumes de solução de TMAH para a solubilização completa das amostras, resultando em um menor volume de diluição, o que é muito importante na análise de elementos a nível traço [47].

Outro reagente que recentemente vem sendo muito utilizado como uma alternativa rápida e simples para o preparo de amostra é o ácido fórmico (HCOOH), garantindo resultados satisfatórios na determinação de diferentes tipos de analitos. O HCOOH é um ácido orgânico relativamente fraco de baixa massa molecular. Esse reagente permanece estável à temperatura ambiente e ao ar, sob condições normais de uso e armazenamento, mas é sensível à luz, ao calor e à umidade. A forma de ação desse reagente é similar a forma apresentada pelo TMAH, necessitando de pequenas quantidades de solução de ácido para solubilizar totalmente as amostras, porém, por ser um ácido fraco, alguns autores relatam a necessidade de aplicar calor, sendo por meio de radiação micro-ondas ou banhos ultrassônicos, para facilitar e acelerar o processo de solubilização [52].

Processos de micro digestão estão sendo estudados, esses procedimentos também são uma forma alternativa de preparo de amostras, já que utilizam quantidades reduzidas de ácidos e amostras, contornando o problema principal dos métodos convencionais de digestão, os quais utilizam grandes quantidades tanto de amostra quanto de reagentes, sendo esses mais propícios a contaminações, e a perdas de analito por volatilização, pois necessitam de um maior tempo de exposição na presença de altas temperaturas para decomposição das amostras[53-56].

Em trabalho realizado no ano de 2009, Campos e colaboradores [57], desenvolveram um sistema para realizar micro digestões de amostras biológicas, o qual tinha por objetivo principal a minimização de contaminações pelo contato direto da amostra com a superfície externa, bem como tentar diminuir os erros relacionados à transferência das amostras de um recipiente para outro durante a etapa de preparo. Com este objetivo, um bloco de digestão foi projetado especialmente para o decorrer das micro digestões, onde apenas 5 mg de amostra eram pesadas diretamente nos vials (copos de autosampler) e

adicionados 100 μ L de solução ácida, após os vials eram adequadamente fechados no bloco e levados a um forno estufa, os quais foram mantidos por uma noite à temperatura de 60°C. Na Figura 4 pode ser visualizado melhor o projeto desenvolvido.

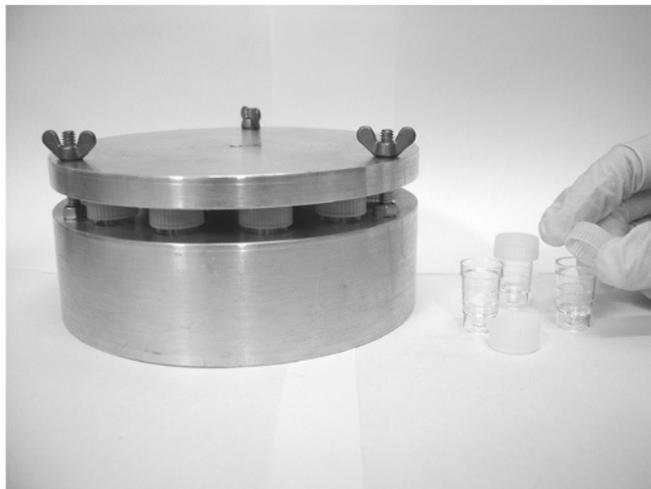


Figura 4 – O bloco digestor [57].

Amostras de materiais de referência certificados de material biológico foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), para determinação de Cd e Cu. A maioria dos resultados obtidos pôde atestar a eficiência da digestão pelo método proposto, já que os valores encontrados para ambos os elementos, na maioria dos CRMs foram concordantes com os valores certificados, validando assim a metodologia. Outro ponto importante ressaltado pelos autores foi que mesmo com massas tão baixas, os CRMs investigados mostraram-se homogêneos suficientes para permitir um coeficiente de variação aceitável para determinação de elementos a nível traço [57].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentos e Parâmetros Instrumentais

As amostras foram trituradas utilizando um mini processador de alimentos (Black&Decker, Brasil) e pesadas utilizando uma balança analítica Ohaus Adventurer (Modelo AR 2140, Pine Brook, NJ, E.U.A.) com resolução de 0,1 mg e tara máxima de 210 g. Para o processo de digestão ácida das amostras, foi utilizado um forno de microondas (Panasonic, Manaus, AM, Brasil, Modelo NN-ST571WRU, 28 Litros, sob uma frequência de 2.450 MHz) e para a solubilização das amostras em meio de ácido fórmico foi utilizado um banho de ultrassom (Modelo Q335D, Quimis, SP, Brasil).

4.1.1 Espectrômetro 1 (F AES)

As determinações de Na e K foram realizadas em um fotômetro de chama modelo B462 (Micronal, São Paulo, SP, Brasil) o qual foi operado nas seguintes condições para ambos os elementos: taxa de aspiração da amostra ou padrão (5 mL min^{-1}), ar comprimido (9 L min^{-1}) a uma pressão de 1 Kg/cm^2 e uma chama de gás butano.

4.1.2 Espectrômetro 2 (F AAS)

Um espectrômetro de absorção atômica modelo AA-6300 (Shimadzu, Japão) com corretor de fundo do tipo Smith-Hieftje foi utilizado para a determinação de Na e K por espectrometria de absorção atômica com chama. Para as determinações de Mg e Zn, foi utilizado um corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério, e as análises para estes elementos foram feitas nas mesmas amostras processadas já citadas, porém, adicionalmente foram analisadas duas amostras in natura de carnes para verificar possíveis perdas desses analitos durante as etapas de processamento, já que estes encontram-se em menor concentração. Uma chama ar-acetileno foi utilizada para todas as determinações. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco Hamamatsu Photonics K.K (Japão), para Na, K, Mg e Zn, e empregadas as condições operacionais recomendadas pelo fabricante do equipamento, tais como comprimento de onda, corrente da lâmpada e largura da banda de resolução espectral, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros operacionais empregados para a determinação de Na, K, Mg e Zn nas amostras de carnes por F AAS.

Analito	Na	K	Mg	Zn
Comprimento de onda (nm)	589,0	766,5	285,2	213,9
Largura da banda de resolução espectral (nm)	0,2	0,7	0,7	0,7
Corrente da lâmpada (mA)	8/600	8/600	8/0	8/0

Todas as análises foram feitas através da utilização de um sistema de microinjeção de amostra adaptado ao nebulizador pneumático, o qual é disponibilizado nesse equipamento pelo fabricante. Através deste sistema, ilustrado na Figura 5, volumes de amostras e padrões de 200 μL eram inseridos e aspirados até a chama para todas as determinações. Comparando esse sistema com o sistema convencional, o qual aspira um volume relativamente elevado (5 mL.min) e, conseqüentemente, gerando quantidades altas de efluentes; o sistema de micro injeção possibilita utilizar volumes reduzidos de amostras, obtendo resultados tão confiáveis quanto o sistema convencional e gerando menos efluentes.

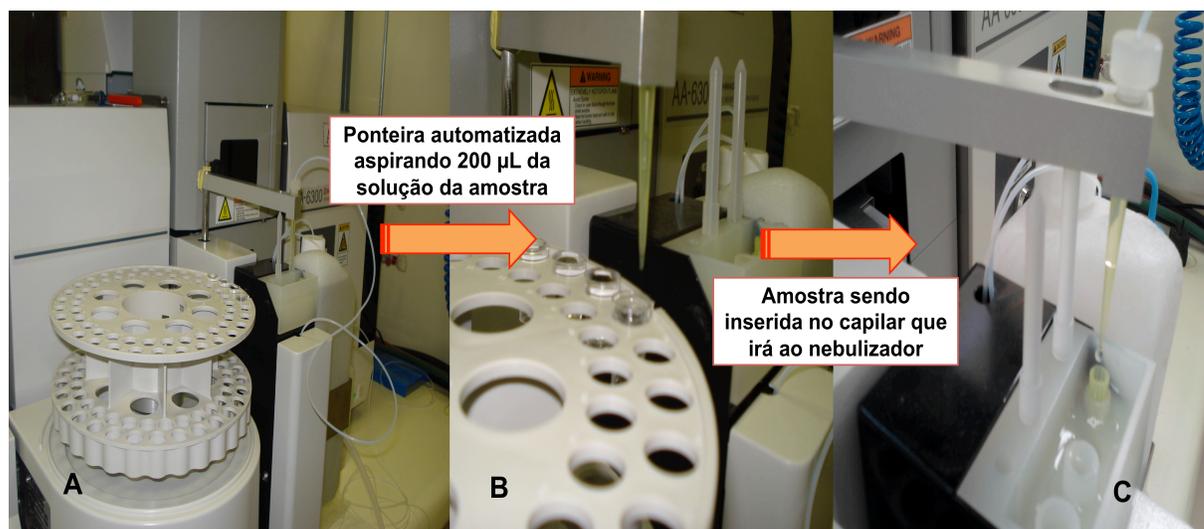


Figura 5 – Sistema automatizado de Microinjeção na Chama. (A) A ponteira com capacidade de aspirar até 200 μL de solução; (B) Ponteira aspirando a amostra e (C) Ponteira inserindo o volume de amostra no capilar conectado ao nebulizador pneumático.

4.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Utilizou-se água deionizada para o preparo de todas as soluções, tratada em um sistema de purificação de água Direct-Q 3 (Millipore Corporation, Bedford, MA, E.U.A.), com resistividade de $18,3 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$. O ácido nítrico (Synth, Brasil) utilizado neste trabalho foi ainda purificado por destilação em um sistema de sub-ebulição de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Todas as vidrarias foram lavadas e, posteriormente, imersas em um banho de 10 % (v/v) HNO_3 , pelo menos, 48 horas e posteriormente lavadas com água deionizada, antes de usar. Soluções de referência de trabalho de Na, K, Mg e Zn foram diariamente preparadas por diluição de uma solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} (Fluka, Buchs, Alemanha) em água deionizada, bem como as soluções tampão utilizadas para minimizar interferências de ionização (CsCl para determinar Na e K, KCl para determinar Mg). Os seguintes reagentes foram utilizados para a microsolubilização das amostras: ácido fórmico (Fluka Analítica, Alemanha), Hidróxido de tetrametilamônio pentahidratado (Sigma Aldrich, Alemanha) e, para a micro digestão foi utilizado o ácido nítrico (Synth, Brasil), previamente purificado, como já citado.

Cabe salientar que todos os resultados analíticos foram obtidos mediante a preparação das curvas de calibração e dos brancos analíticos usando soluções no mesmo meio utilizado para a decomposição das amostras (TMAH, ácido fórmico ou ácido nítrico diluído). As amostras foram diluídas com água desionizada quando necessário, para ficarem dentro do intervalo da faixa de calibração.

4.3 Amostras e tratamentos das amostras

Para o desenvolvimento dos procedimentos de preparo de amostras e verificação da concentração dos respectivos analitos, amostras comerciais de salsicha, almôndega e carne bovina fatiada de diferentes fabricantes foram utilizadas, bem como, amostras de carnes bovinas e suínas frescas. Estas amostras foram inicialmente lavadas com água deionizada, cortadas com faca de inox e homogeneizadas. As amostras foram analisadas imediatamente após este procedimento ou congeladas a uma temperatura de $-16 \text{ }^\circ\text{C}$ em potes de plástico, previamente descontaminados. Para a análise, as amostras congeladas

eram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas. Após este procedimento, uma alíquota era retirada para então prosseguir as análises

Primeiramente, aproximadamente 0,5 g de amostras (processadas e frescas) foram pesadas em um vidro de relógio, em triplicata, e levadas até uma estufa, onde foram secas a uma temperatura de aproximadamente 103 °C por 24 horas e permaneceram em um dessecador até a pesagem a temperatura ambiente. Este estudo foi realizado até as amostras adquirirem peso constante, eliminando assim, a umidade. Através deste procedimento, pôde-se avaliar possíveis erros de pesagem e ainda calcular o teor de umidade para cada amostra a ser analisada. O teor de umidade foi determinado multiplicando-se a massa da amostra seca por 100 % e dividindo-a pela massa da amostra úmida.

As amostras foram preparadas utilizando-se diferentes procedimentos para determinação de Na e K; e para Mg e Zn, os quais foram descritos respectivamente nos itens a seguir.

4.3.1 Determinação de Na e K em amostras processadas de carnes.

Os seguintes materiais de referência certificados (CRMs) foram utilizados neste trabalho para o desenvolvimento e validação das metodologias propostas: CRM 1546 Carne Homogênea, CRM 1577c fígado bovino, ambos produzidos pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST). Tanto as amostras reais (carnes processadas) quanto os CRMs citados anteriormente, foram tratados a partir de três procedimentos de preparo de amostras, os quais estão descritos a seguir:

4.3.1.1 Procedimento 1 – Microdigestão (Mineralização com HNO₃ em sistema fechado)

As amostras foram pesadas e preparadas diretamente em frascos volumétricos auto-sustentáveis de polipropileno (PP) de 50 mL. Foram pesadas minuciosamente uma porção de 10 mg, aproximadamente, de amostras de carnes processadas e adicionados 150 µL de HNO₃ concentrado. As amostras foram levadas a um forno de microondas, onde primeiramente foi otimizado a potência mais adequada e o tempo necessário para realizar de uma forma eficiente as digestões. Posteriormente, as amostras foram colocadas uma a uma no centro do prato giratório do forno, como sugerido por Rosini e

colaboradores, já que segundo os autores, este é o melhor local de distribuição da radiação [58]. No forno, as amostras permaneceram por 5 minutos na potência máxima determinada (680 Watts). Foi observada a digestão completa quando houve a dissolução total da gordura, e após o resfriamento, as amostras foram aferidas até 50 mL com água desionizada.

Dessa maneira, como mencionado anteriormente, foi necessário realizar um estudo preliminar para verificar a veracidade da potência utilizada no forno microondas, através de testes para otimizar seu desempenho. A calibração do forno foi feita com o auxílio de um béquer de 2 litros na presença de 1 litro de água destilada. Este estudo foi feito variando-se a potência do equipamento de 1 a 10 W em um intervalo de tempo de 120 s. No intervalo entre o cálculo de cada potência trocou-se a água destilada e mediu-se a temperatura inicial e final. Para calcular a potência utilizou-se a fórmula abaixo (Equação 4) descrita recentemente por Rosini e colaboradores [58].

$$P = \frac{C_p \cdot n \cdot \Delta T}{t}$$

Equação 4

Onde:

C_p (Capacidade Calorífica da água) = 75,312 J K⁻¹ mol⁻¹

n (Quantidade de Matéria Utilizada em Mols) = 55,6 mols para 1 litro

ΔT (Variação de Temperatura em Kelvin) = Temperatura Final – Temperatura Inicial

t (Tempo de Aquecimento) = 120 segundos

Sendo assim, a partir deste estudo de calibração, também foi necessário otimizar as condições ideais (tempo e potência) para obter uma digestão completa e eficiente das amostras. Para tanto, foram digeridas amostras do CRM 1577c em diferentes tempos e níveis de potência, com o propósito de avaliar as melhores condições da etapa de digestão, onde as concentrações encontradas para Na e K foram comparadas com os valores certificados para estes elementos. A determinação de ambos elementos foi realizada através de um fotômetro em chama.

É preciso destacar que esse procedimento (Microdigestão) foi aplicado somente para a determinação de Na e K nas amostras de carnes analisadas, já que esses elementos encontram-se em altas concentrações em produtos processados e, assim necessitam de

um alto fator diluição, permitindo o uso de frascos com uma maior capacidade volumétrica, o que faz com que estes sejam aptos a garantir a total solubilização dos gases formados durante as reações de mineralização. Cabe salientar, que a aplicabilidade deste procedimento para determinação de elementos que se encontram em menores concentrações (como exemplo Mg e Zn), necessita de uma melhor otimização das condições de trabalho, aliada a utilização de um sistema que permita a digestão das amostras sob radiação microondas associado ao uso de micro frascos (digestão em micro escala).

Na figura 6, está demonstrado as etapas do procedimento proposto de preparo de amostra para determinação de Na e K.

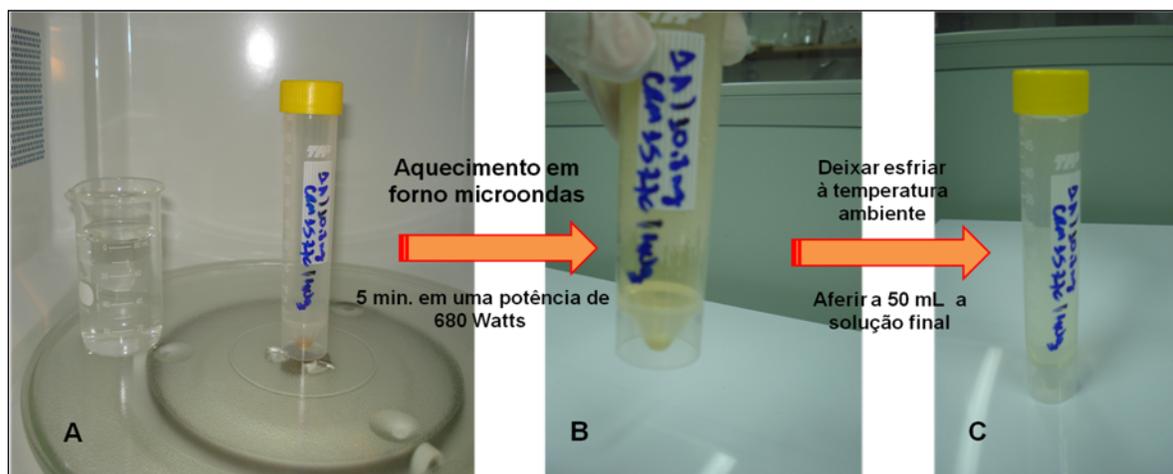


Figura 6 – Microdigestão de uma amostra de carne utilizando HNO_3 . (A) aproximadamente 10 mg de amostra com 150 μL de HNO_3 no forno microondas ; (B) Frasco com o processo de digestão final e (C) aferição da solução final com água deionizada.

4.3.1.2 Procedimento 2 – Microsolubilização alcalina com TMAH.

As amostras foram preparadas através de uma simples mistura de aproximadamente 10 mg de amostra com uma solução de TMAH 25 % m/v. Um volume de 150 μL da solução de TMAH foi adicionado nas amostras, as quais foram pesadas diretamente nos frascos volumétricos de 50 mL de polipropileno. Estas ficaram em contato com a solução alcalina durante um período de aproximadamente, 12 horas (over night) em temperatura ambiente e o frasco permaneceu fechado até a completa solubilização. O volume foi

completado a 50 mL com água deionizada, e a concentração final da solução foi de 0,075 % m/v de TMAH.

4.3.1.3 Procedimento 3 – Microsolubilização com ácido fórmico.

As amostras de carne foram solubilizadas em meio de ácido fórmico segundo o método proposto por Scriver et. al. [52]. Porém, a metodologia foi adaptada ao sistema em micro escala. A mesma massa usada nos experimentos anteriores foi pesada diretamente em frascos de polipropileno e 200 µL de ácido fórmico foram adicionados. A mistura foi colocada em um banho de ultrassom a 70°C por um período de 2-3 h até completa solubilização. Após o resfriamento, o volume foi completado a 50 mL com água deionizada para as subseqüentes análises.

Dessa maneira, é importante ressaltar que na determinação de Na e K, primeiramente, foi realizado o procedimento de microdigestão com HNO₃, e essas amostras foram analisadas tanto por F AES (Fotômetro em chama) quanto por F AAS, sendo que os resultados obtidos por ambas as técnicas foram comparados e submetidos a testes estatísticos, a fim de verificar a veracidade dos resultados obtidos.

Posteriormente, as amostras foram submetidas aos outros dois procedimentos (Microsolubilização alcalina e ácida), e essas amostras foram analisadas somente por F AES, já que no primeiro estudo a técnica foi atestada como suficiente para determinação de Na e K.

4.3.2 Determinação de Mg e Zn em amostras processadas e in natura de carnes.

Para o desenvolvimento e validação da metodologia proposta para determinação de Mg e Zn em amostras processadas e “in natura” foram empregados os seguintes materiais de referência certificados (CRMs): CRM 1577c e CRM 1577b, ambos de fígado bovino e, CRM 8414 Músculo Bovino, todos produzidos pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST). Tanto as amostras reais quanto os CRMs citados, foram preparados somente por um tratamento utilizando TMAH (Microsolubilização), porém, quantidades de amostras diferentes foram necessárias para determinação de Mg e Zn, as quais são relatadas a seguir:

4.3.2.1 Tratamento das amostras para determinação de Mg.

As amostras foram preparadas diretamente em frascos volumétricos do tipo eppendorf de 2 mL. As massas pesadas e o volume adicionado de TMAH, bem como, o tempo necessário para ocorrer a completa solubilização foram iguais ao procedimento de microsolubilização alcalina para determinação de Na e K, mencionada anteriormente (subitem 4.3.1.2). Após a solubilização, as amostras foram aferidas a 2 mL com água desionizada para posterior análise.

4.3.2.2 Tratamento das amostras para determinação de Zn.

Neste procedimento, as massas de amostras reais pesadas foram distintas para alguns tipos de amostras, tendo em vista as baixas concentrações deste analito. Para as amostras: almôndega, carne bovina processada enlatada e carne bovina "in natura" foram pesadas uma massa de aproximadamente 20 mg, já para as amostras: carne suína fresca e salsicha foi necessário pesar uma massa de 50 mg. A essas respectivas massas foi adicionado o mesmo volume de hidróxido de tetrametilamônio (150 μ L), sendo esse volume, suficiente para solubilizar completamente as amostras.

A partir da Figura 7, pode ser visualizado como o processo de microsolubilização das amostras e CRMs foi realizado para a determinação de Mg e Zn.

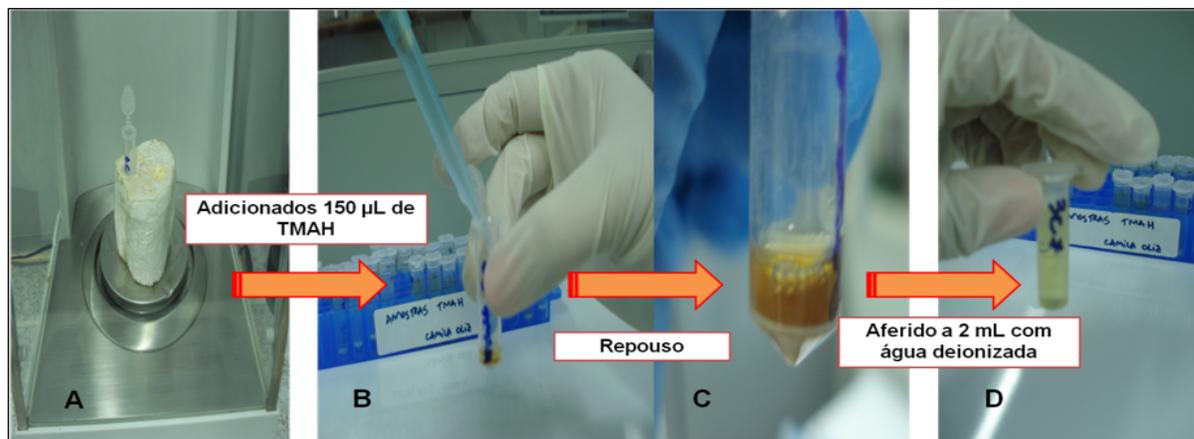


Figura 7 – Microsolubilização de uma amostra de carne utilizando TMAH. (A) aproximadamente 10 mg de amostra sendo pesadas em balança analítica; (B) 150 μ L de TMAH sendo adicionado na amostra; (C) Suspensão da amostra formada após o repouso (over night); (D) aferição da solução final com água deionizada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Umidade das amostras

Neste trabalho, primeiramente foi realizado um estudo sobre a perda de massa pela umidade característica de cada amostra, tendo em vista que esta é uma variável importante, já que a quantidade de energia absorvida pela carne está diretamente relacionada ao seu teor de umidade, e que a elevação da temperatura das amostras submetidas à radiação, sob um tempo de exposição fixo, será maior quanto maior for a umidade característica relacionada a amostra de carne em análise. Consequentemente, uma maior quantidade de água será removida por evaporação. Desta forma, o teor de umidade das respectivas amostras de carnes é uma variável importante que deve ser levada em consideração, pois em amostras desidratadas o aquecimento não é eficiente, o que pode vir a dificultar a interação com o ácido durante o processo de mineralização, diminuindo o seu poder oxidante e uma incompleta digestão das amostras [59].

No Brasil, o método oficial para o cálculo do teor de umidade de uma determinada amostra, estabelecido pelo Ministério da Agricultura (MAPA), é baseado no tratamento da amostra em uma estufa mantida a uma temperatura de aproximadamente $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas [60]. Seguindo essas recomendações, conforme já descrito no item 4.3, pode-se avaliar as porcentagens de umidade referente a cada amostra.

As amostras em geral apresentaram um teor de umidade de aproximadamente 70 % em massa, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de umidade encontrado nas diferentes amostras estudadas (n=3).

Amostras	Teor de Umidade (%)
Carne bovina in natura	74,8
Carne suína in natura	73,4
Almôndega	69,9
Salsicha	72,9
Carne bov. processada enlatada	65,5

5.2 Resultados de Na e K em amostras de carnes processadas

5.2.1 Estudos de calibração da potência do forno de micro-ondas e otimizações das condições ideais para as microdigestões das amostras.

Os primeiros estudos para determinação de Na e K nas amostras de carne processadas tiveram por objetivo criar uma metodologia simples de preparo de amostras e de fácil preparo. A metodologia proposta, mesmo que seguisse alguns dos procedimentos de referência já estipulados pelo Ministério da Agricultura para análise de carnes [61], como por exemplo, o uso da digestão ácida com HNO_3 sob aquecimento, inseriu diversas mudanças. Entre estas se destacam o uso de quantidades reduzidas de amostras e, conseqüentemente de reagentes, bem como a praticidade e segurança da microdigestão em sistema fechado, utilizando aquecimento por radiação micro-ondas.

Assim sendo, primeiramente foi realizado um estudo para verificar a real potência que estava sendo aplicada nas amostras em diferentes níveis presentes do forno micro-ondas. A Tabela 4, abaixo, apresenta os valores calculados de acordo com a Equação 4.

Tabela 4 – Valores da Potência Indicada no Forno Micro-ondas e a Potência Calculada.

Níveis	Potência Indicada (W)	Potência Calculada (W)
1	150	52,34
2	200	139,58
3	300	195,40
4	400	279,16
5	500	348,95
6	550	401,29
7	650	488,52
8	750	558,31
9	800	610,65
10	950	680,44

W = Watts = J/s

De acordo com os resultados apresentados nesta Tabela, pode-se verificar que a etapa de calibração da potência do forno é de fundamental importância, tendo em vista a

grande discrepância entre os valores das potências indicadas pelo fabricante e as reais potências, já que este é um parâmetro de otimização importante no preparo das amostras.

Para o desenvolvimento desta metodologia, alguns parâmetros como o tempo de irradiação as quais as amostras foram submetidas e a potência aplicada foram otimizados, conforme descrito a seguir. Na Tabela 5, estão apresentados os resultados dos testes realizados, em diversos tempos e níveis de potência, a fim de fixar o menor tempo e a melhor potência para obter resultados confiáveis através do processo de microdigestão.

Tabela 5 – Testes de otimização do tempo e potência aplicada nas amostras do CRM 1577c por microdigestão.

Amostra	Níveis	Tempo de Irradiação (min)	Resultados (%)	
			Na	K
1	5	5	0,2195	0,9612
2	10	5	0,1976	0,9612
3	10	10	0,2195	1,0755

1,2 e 3 (Amostras preparadas igualmente de CRM1577c); % = g/100g

De acordo com a tabela 5, e com o conhecimento dos valores certificados e esperados para Na e K no CRM 1577c, de 0,2033 % e 1,023 %, respectivamente, o tratamento mais adequado foi evidenciado na amostra 2, pois além de proporcionar valores mais próximos dos esperados para ambos elementos, também pode ser constatado um menor tempo requerido para a realização do processo de microdigestão. Desta forma, as condições escolhidas e fixadas para todas as digestões foram: a potência do nível máximo (680 W) por um tempo de irradiação das amostras de 5 minutos.

5.2.2 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito para as curvas de calibração para Na e K a partir da metodologia proposta de preparo das amostras por microdigestão, bem como em meio de TMAH e ácido fórmico através do uso de técnicas espectrométricas são apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Parâmetros de Mérito para determinação de Na e K em amostras de carnes processadas em meio HNO₃ por F AES e F AAS.

Analito	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	F AES			F AAS		
		a	LD	R	a	LD	R
		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	
K	0,1 – 2,0	0,4236	0,037	0,9998	0,5745	0,218	0,9951
Na	0,1 – 2,0	0,2416	0,040	0,9999	0,4554	0,261	0,9993

a: coeficiente angular da curva; LD: limite de detecção na solução de medida; R: coeficiente da curva de calibração.

Tabela 7 – Parâmetros de mérito para a determinação de Na e K em carnes processadas por FAES após tratamento com TMAH e ácido fórmico.

Analito	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	TMAH			Ácido Fórmico		
		a	LD	R	a	LD	R
		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	
K	0,1 – 0,5	0,9507	0,023	0,9992	1,8371	0,009	0,9996
Na	0,1 – 0,5	0,9803	0,029	0,9999	2,4733	0,005	0,9993

a: coeficiente angular da curva; LD: limite de detecção na solução de medida; R: coeficiente da curva de calibração.

Boa linearidade nas curvas foram obtidas para estes elementos ($R > 0,99$), independente do método utilizado para a preparação da amostra. A partir da avaliação do coeficiente angular das curvas de calibração obtidos, pode-se estimar a sensibilidade referente a cada método de preparo. O método proposto mesmo apresentando uma sensibilidade menor em relação aos outros procedimentos utilizados de microsolubilização, foi considerado eficiente para determinação de Na e K, já que esses elementos encontram-se em elevadas concentrações nas amostras analisadas e, dessa maneira, a sensibilidade adquirida é suficiente para o controle destes.

Ressalta-se ainda que, as faixas de trabalho (faixa linear) utilizadas nos métodos de microsolubilização foram menores, atestando assim uma boa sensibilidade dos procedimentos estudados para a determinação dos elementos nas amostras. Esses valores devem estar associados, provavelmente, à composição do meio usado no preparo das amostras, pois a sensibilidade de um método é diretamente relacionada com variáveis importantes, tais como a tensão superficial, viscosidade e pH do meio.

Os métodos de uma forma geral apresentaram baixos limites de detecção LOD (definidos como a concentração equivalente a três vezes o desvio padrão de dez medidas do branco dividido pela sensibilidade da curva).

5.2.3 Validação da metodologia proposta

Com o objetivo de verificar a exatidão dos resultados obtidos pelo método da microdigestão ácida proposto para determinação de Na e K nas amostras de carne processadas, diferentes procedimentos foram empregados. A veracidade dos resultados foi então avaliada através do uso de diferentes técnicas analíticas, análise de CRMs, bem como através da comparação dos resultados por diferentes procedimentos de preparo das amostras, conforme descrito abaixo.

Primeiramente, as amostras de carne processadas foram analisadas para estes analitos utilizando duas diferentes técnicas analíticas, FAAS e FAES. No entanto, para análise por absorção, foi necessário a adição de uma solução tampão de concentração conhecida (0,1 % de solução de CsCl), concentração indicada pelo fabricante, a qual foi adicionada na presença da solução das amostras e padrões para uma completa minimização das interferências de ionização, uma vez que estes elementos apresentam um baixo potencial de ionização, havendo a formação de íons nas temperaturas normalmente utilizadas na chama [38].

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, pode-se verificar que o procedimento proposto, baseado na microdigestão ácida, aplicado à análise de três amostras reais de carnes, para a determinação destes elementos por diferentes técnicas analíticas, se mostrou eficaz, uma vez que não houve diferenças significativas entre os

resultados a um nível de confiança de 95 % pela aplicação do teste *t- Student pareado* (Teste t- Student que avalia pares de dados).

Tabela 8 – Valores obtidos de Na e K em amostras de carnes processadas por F AES e F AAS (n=3).

Analito	Amostra	F AES			F AAS		
		Encontrado (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)	LD (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)	LD (mg L ⁻¹)
K	A	1.363 ±68	4,9	0,037	1.128 ±52	4,6	0,218
	B	958 ±37	3,9		1.117 ±51	4,5	
	C	1.687 ±89	5,2		1.752 ±22	1,3	
Na	A	5.780±237	4,1	0,040	5.607±118	2,1	0,261
	B	8.859±77	0,9		8.393±215	2,6	
	C	2.952±10	0,3		2.585±79	3,1	

A: Carne Bovina Processada; B: Salsicha Vienna; C: Almôndega. RSD, Desvio Padrão Relativo; LD, Limite de Detecção

Posteriormente, conforme apresentado na Tabela 9, a validação da metodologia por microdigestão também pode ser avaliada a partir da análise das mesmas amostras de carne processadas preparadas em diferentes meios (TMAH e ácido fórmico). A partir deste estudo, foi possível verificar que independente do meio de preparo, as concentrações encontradas para os analitos em estudo, apresentaram valores concordantes (95 % pela aplicação do teste *t- Student pareado*), o que também evidenciou a possibilidade do uso de microsolutibilizações tanto em meio alcalino como em meio ácido.

Tabela 9 – Resultados obtidos para Na e K em amostras de carnes processadas preparadas em dois diferentes meios por FAES (n=3).

Analito	Amostra	TMAH			Ácido Fórmico		
		VE (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)	LD (mg L ⁻¹)	VE (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)	LD (mg L ⁻¹)
K	A	1.259 ± 97	7,7	0,023	1.297 ± 11	0,8	0,009
	B	1.048 ± 65	6,2		1.141 ± 77	6,7	
	C	1.437 ± 44	3,1		1.676 ± 17	1,0	
Na	A	5.368 ± 37	0,7	0,029	5.157 ± 232	4,5	0,005
	B	8.751 ± 83	1,0		8.569 ± 133	1,6	
	C	2.860 ± 62	2,2		2.904 ± 75	2,6	

A: Carne Bovina Processada; B: Salsicha Vienna; C: Almôndega.
VE, Valor encontrado; RSD, Desvio Padrão Relativo; LD, Limite de Detecção

Com este mesmo objetivo, diferentes amostras de material biológico certificadas foram analisadas para determinação de Na e K por F AAS e F AES. Com base nos resultados apresentados respectivamente nas Tabelas 10 e 11, pode-se verificar que os valores de concentração para Na e K obtidos para os CRMs estudados foram satisfatórios, com aproximadamente 95 % de concordância entre os valores encontrados e os valores certificados. De acordo com a Tabela 10, exposta a seguir, pode-se evidenciar também que LDs maiores foram obtidos por F AAS para ambos os elementos, o que certamente está relacionado ao sistema utilizado para introdução da amostra no equipamento, onde apenas 200 µL da solução da amostra é aspirada por um sistema de microinjeção na chama.

Tabela 10 – Valores de Na encontrados nos CRMs por F AAS e F AES e os valores certificados (n=3).

Na					
CRMs	F AAS			F AES	
	VC	VE	RSD (%)	VE	RSD (%)
NIST 1577c ^a	0,2033 ± 0,0064	0,1923 ± 0,0148	7,7	0,1952±0,0072	3,7
NIST 1546 ^b	9.990 ± 716	10.422 ± 861	8,3	10.672 ± 430	4,0

^a% = g/100g; ^bppm = mg Kg⁻¹
 VC = Valor Certificado; VE = Valor Encontrado
 RSD = Desvio Padrão Relativo

Tabela 11 – Valores de K encontrados nos CRMs por F AAS e F AES e os valores certificados (n=3).

K					
CRMs	F AAS			F AES	
	VC	VE	RSD (%)	VE	RSD (%)
NIST 1577c ^a	1,023 ± 0,064	0,999 ± 0,030	3,0	1,017 ± 0,050	4,9
NIST 1546 ^b	2.370 ± 200	2.373 ± 151	6,4	2.831 ± 128	4,5

^a% = g/100g; ^bppm = mg Kg⁻¹
 VC = Valor Certificado; VE = Valor Encontrado
 RSD = Desvio Padrão Relativo

5.2.4 Avaliação dos Resultados

Avaliando-se as concentrações Na e K obtidas nas três amostras de carnes processadas analisadas (Tabelas 8 e 9), pode-se atestar que em todas as amostras, as concentrações de Na sempre foram bem maiores que as de K. O que ressalta a importância do desenvolvimento de métodos de análise que sejam de uma forma geral simples, de baixo custo e principalmente confiáveis, a fim de que estes possam vir a ser utilizados para o controle de qualidade destes alimentos, tendo em vista que altas concentrações de Na e baixas concentrações de K, podem acarretar a um aumento da

pressão arterial, e o que se recomenda é que esses elementos estejam em quantidades semelhantes nos alimentos. No entanto, estes resultados estão de acordo com a literatura, já que sais de Na são os conservantes mais comumente adicionados aos alimentos, e em produtos cárneos industrializados este sal desempenha diversas funções. As principais funções dos sais à base de Na adicionados em concentrações entre 2,5 a 3,0 % em massa é a inibição do crescimento de microorganismos, além de também salientar o paladar dos alimentos [31,62]. Com esse desequilíbrio, concentrações relativamente altas de Na nos alimentos processados de uma forma em geral são esperadas.

Das três amostras de carne analisadas, a salsicha foi a que apresentou maior concentração de Na, o que pode está associada ao uso de altas quantidades de sais a base deste elemento em sua composição, como: cloreto de sódio (sabor), nitrito/nitrato de sódio (conservante), fosfato de sódio (estabilizador) e eritorbato de sódio (antioxidante). Comparado com os objetivos atuais (OMS), as amostras de salsichas analisadas apresentaram valores de sódio de aproximadamente 4 vezes maiores do que o permitido (5 g Na por dia), enquanto que as demais amostras apresentaram concentrações de menor desproporção [25,26].

Ainda discutindo a respeito das altas concentrações de Na encontradas nas amostras, é necessário mencionar também a grande discrepância entre as informações fornecidas no rótulo das embalagens, e os valores obtidos na análise. Sendo que, comparando-se os dados obtidos e as concentrações informadas nos rótulos, os valores diferiram mais de 100 % dos valores experimentais. De acordo com as normas brasileiras, fiscalizadas pela Anvisa [63], uma tolerância de 20 % em relação à concentração informada no rótulo e a concentração encontrada é permitida. Entretanto, para produtos que contenham um excesso de um dado micronutriente, a empresa deve manter disponíveis estudos que justifiquem esta variação.

Recentemente, diversos acordos estão sendo firmados entre o governo brasileiro e as indústrias alimentícias com o intuito da redução gradual de Na nos alimentos industrializados, a fim de reduzir pela metade o consumo diário de sal dos brasileiros, com uma meta de reduzir aproximadamente 40 % do sal consumido pela população até 2020 [64]. Desta forma, a importância do desenvolvimento dessas novas metodologias

analíticas fica evidente, possibilitando que as indústrias alimentícias possam fazer o controle tanto de Na como de K nos alimentos a serem consumidos pela população.

5.3 Resultados de Mg e Zn em amostras de carnes in natura e processadas.

O presente trabalho ressalta também a importância do desenvolvimento de metodologias analíticas que possam ser aplicadas para avaliar as concentrações de Mg e Zn, bem como dos principais minerais presentes em produtos a base de carne, que por sua vez podem ser perdidos em quantidades significativas em alimentos que são suportados por tratamentos industriais agressivos, provocando alterações no produto final, bem como a biodisponibilidade dos mesmos [5,27].

Para o desenvolvimento do procedimento proposto e verificação da concentração dos respectivos analitos, amostras comerciais de carnes in natura e processadas, foram preparadas em meio alcalino (Microsolubilização com TMAH), método também proposto neste presente trabalho, já que essa solução têm se apresentado como uma boa alternativa de preparo para amostras biológicas, fornecendo soluções com características de uma suspensão, apresentando um baixo fator de diluição, as quais permanecem estáveis por meses em temperatura ambiente [45,46,47].

Para as determinações de Mg por F AAS foi necessário a adição tanto nas amostras como nos padrões, de uma solução tampão de KCl, afim da minimização dos efeitos de ionização sofridos por este elemento na chama, devido ao seu baixo potencial de ionização. Como o K possui um menor potencial de ionização, quando comparado ao Mg, ele é mais facilmente ionizável, permitindo que os átomos de Mg permaneçam no estado fundamental aptos a absorver a radiação vinda da fonte. É importante ressaltar que a solução tampão indicada pelo fabricante (LaCl_3 0,1 % m/v), para a minimização desta interferência não pode ser usada em meio de TMAH, pois na presença deste meio houve a formação de um precipitado, não sendo possível a realização das leituras sob estas condições.

Sendo assim, a realização de um estudo adicional com o objetivo de otimizar a concentração necessária da solução tampão (KCl) para uma completa minimização destas interferências se fez necessário. De acordo com a Figura 8, pode-se verificar que a partir da adição de 10 a 70 mg L⁻¹ da solução tampão se observa um platô que se

mantém constante, sendo possível alcançar o máximo de absorvância em meio de uma solução de 10 mg L⁻¹ de KCl, sendo que na presença deste meio é possível trabalhar com o máximo em sensibilidade para o Mg com uma completa minimização das interferências de ionização sofridas por este elemento. Sendo assim, os resultados analíticos foram obtidos mediante a elaboração de uma curva de calibração, utilizando soluções em meio de TMAH com 10 mg L⁻¹ de KCl. As amostras foram diluídas com água deionizada, e a mesma concentração de solução tampão foi adicionada.

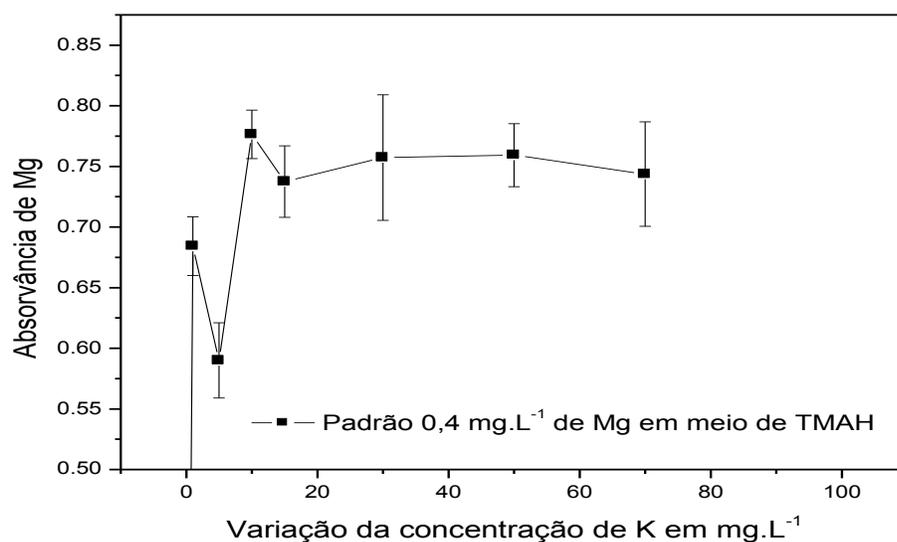


Figura 8 – Estudo da concentração de KCl (mg L⁻¹) para minimização de interferência por ionização, pela medida de absorvância para solução de 0,4 mg L⁻¹ Mg.

Para determinar as concentrações de Zn nas amostras de carne analisadas, não foi preciso à adição de qualquer solução tampão, as análises decorreram sem apresentar problemas de interferências e, os parâmetros utilizados foram exatamente os recomendados pelo fabricante.

5.3.1 Parâmetros de Mérito

Os parâmetros de mérito obtidos para determinação de Mg e Zn em amostras de carnes por F AAS a partir das metodologias de preparo das amostras desenvolvidas, estão apresentados na Tabela 12. Como pode ser observado, as curvas de calibração em

meio de TMAH para ambos os analitos estudados apresentaram bons coeficientes de correlação linear, com $R > 0,99$; bem como mostraram sensibilidades adequadas para atender ao objetivo que o trabalho se propõe. É importante ressaltar também que a análise destas amostras mesmo que em micro escala, através do uso de uma quantidade em massa relativamente pequena, apresentou-se como uma metodologia adequada, já que o desvio padrão relativo (RSD) entre as medidas (Tabelas 13 e 14) apresentou uma boa reprodutibilidade dos resultados ($RSD < 10\%$), parâmetro este fundamental para assegurar a confiabilidade das análises, assim como a exatidão requerida.

Tabela 12 – Parâmetros de mérito para determinação de Mg e Zn em amostras de carnes por F AAS.

Analito	Faixa Linear (mg.L ⁻¹)	TMAH		
		a (mg L ⁻¹)	LD (µg L ⁻¹)	R
Mg	0,1 – 0,4	1,8722	12	0,9997
Zn	0,1 – 1,5	0,5349	92	0,9984

a: coeficiente angular da curva; LD: limite de detecção na solução de medida; R: coeficiente da curva de calibração.

5.3.2 Validação da metodologia proposta

Com o objetivo de verificar a exatidão dos resultados obtidos a partir da metodologia proposta, foram analisadas três amostras de referência certificadas de carne, fígado bovino (NIST 1577b e NIST 1577c) e músculo bovino (NIST 8414). Segundo os resultados apresentados na Tabela 13, foi possível verificar uma boa concordância entre os resultados obtidos em meio de TMAH e os valores certificados, com desvio padrão relativos (RSD) sendo inferior a 10 % para ambos analitos, o que comprova a veracidade dos resultados. Além disso, a aplicação do teste-t de Student mostrou para um nível de 95 % de confiança, que os resultados encontrados não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores de concentração certificados.

Tabela 13 – Resultados analíticos para Mg e Zn em meio de TMAH obtidos em três materiais de referência certificados (média \pm desvio para n=3) por FAAS.

Amostra/Analito	TMAH		
	Valor Certificado (mg Kg ⁻¹)	Determinado (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)
<i>CRM 1577b</i>			
Mg	601 \pm 28	572 \pm 10	1,7
Zn	127 \pm 16	132 \pm 8	6,1
<i>CRM 1577c</i>			
Mg	620 \pm 42	634 \pm 36	5,7
Zn	181,1 \pm 10	185,5 \pm 8	4,3
<i>CRM 8414</i>			
Mg	960 \pm 95	839 \pm 80	9,5
Zn	142 \pm 14	140 \pm 14	10

RSD = Desvio Padrão Relativo

5.3.3 Avaliação dos Resultados

Como pode ser observado nas Tabelas 14 e 15, concentrações significativas tanto para Mg como para Zn foram encontradas nas amostras de carnes analisadas. No entanto, analisando os resultados das concentrações para estes elementos de uma forma geral, verifica-se que os produtos a base de carne são uma fonte mais rica de Mg do que de Zn, visto que concentrações bem menores foram encontradas para este nutriente, o que não desmerece a importância das carnes na alimentação, já que o Zn é um micronutriente essencial que mesmo estando em baixas concentrações desempenha diversas funções no organismo [19-22]. Cabe salientar também, que concentrações similares de Zn em carnes in natura foram encontradas em um trabalho de Andrade et.al. (2004), que obtiveram valores de aproximadamente 20 mg Kg⁻¹ de Zn em amostras bovinas frescas (tipo alcatra) [28].

De acordo com os resultados apresentados para Mg (Tabela 14), as amostras de carnes processadas apresentam valores de concentrações menores quando comparadas com as amostras de carne in natura. Estas variações podem ser devido a uma série de razões, que podem estar diretamente relacionados a diferenças na composição nutricional dos produtos de carne selecionados para análise, a dieta dos animais e o solo em que este foi criado. Além disso, pesquisas recentes mostram perdas de qualidade nutricional de vitaminas e minerais durante o processamento de alimentos, como relatados por

Andrade e colaboradores e, Mistura & Colli [4,28,65]. Estes relatos, ressaltando a importância das indústrias em garantirem a qualidade do produto final, comprovando a partir do controle de qualidade dos principais nutrientes que fazem parte deste alimento, que a integridade nutricional foi mantida após este ter passado por diversos processos.

Tabela 14 – Resultados encontrados de Mg nas amostras de carnes em meio de TMAH por F AAS (n=3).

Amostras	Mg		
	VE (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)	LD (µg L ⁻¹)
Almôndega	126,84 ± 3,29	2,6	
Carne Bov. Proc. Enlat.	120,58 ± 1,51	1,3	
Salsicha	167,03 ± 9,10	5,4	12
Carne Bov. In. Nat.	215,34 ± 13,82	6,4	
Carne Suína In. Nat.	253,10 ± 22,74	9,0	

VE = Valor Encontrado
RSD = Desvio Padrão Relativo
LD = Limite de Detecção

Tabela 15 – Concentrações de Zn obtidas em amostras reais de carnes (in natura e processadas) (n=3).

Amostras	Zn		
	VE (mg Kg ⁻¹)	RSD (%)	LD (µg L ⁻¹)
Almôndega	12,13 ± 0,86	7,1	
Carne Bov. Proc. Enlat.	65,25 ± 4,70	7,2	
Salsicha	10,28 ± 0,67	6,5	92
Carne Bov. In. Nat.	21,94 ± 1,86	8,5	
Carne Suína In. Nat.	18,11 ± 0,82	4,5	

VE = Valor Encontrado
RSD = Desvio Padrão Relativo
LD = Limite de Detecção

Um estudo recentemente publicado em 2011 por Nunes e colaboradores, demonstra a praticidade da utilização do TMAH para solubilização de amostras de carnes, mostrando-se uma fonte alternativa atraente aos métodos convencionais de análise, pela sua praticidade no preparo das amostras e nos resultados eficientes que apresentou [66]. De acordo com os autores, que analisaram amostras de carnes processadas e frescas da mesma natureza, as quais foram estudadas no presente trabalho, porém de marcas diferentes, o uso de um método baseado na solução das amostras na presença deste reagente alcalino, mostrou ser um método reprodutível, sem precisar de instrumentação especial, tornando a metodologia mais viável e menos dispendiosa.

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser comparados com os valores encontrados pelos autores neste último trabalho citado, entretanto, é importante ressaltar que o presente trabalho além de analisar amostras diferentes de carnes, também foi realizado em micro escala, o que propiciou uma redução significativa no volume de reagente utilizado e o uso de massas de amostra aproximadamente 90 % menores.

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que a pequena porção de amostra utilizada foi suficiente para atestar uma homogeneidade, representando o restante da amostra, mostrando que a micro amostragem pode ser aplicada para esse tipo de matriz com bastante segurança em obter resultados precisos e exatos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos para Na e K ressalta-se a importância da determinação desses metais em alimentos processados, já que foi constatada uma elevada diferença entre as concentrações de Na e K nas amostras reais, podendo assim, ser um problema de saúde pública, pois essa desproporção pode ocasionar várias doenças cardiovasculares. As altas concentrações de Na encontradas nas amostras de carnes analisadas comprovam a importância de um controle de qualidade, bem como uma redução do teor de sal nos alimentos processados produzidos no Brasil, como no mundo de uma forma geral.

Pode-se dizer que o método de microdigestão proposto no presente trabalho, apresenta-se como uma alternativa promissora para substituir o método convencional de preparo de amostras indicado pelo Ministério da Agricultura, o qual utiliza grandes quantidades de amostras e reagentes em um bloco digestor, sendo um procedimento tedioso e mais suscetível a contaminações e perdas de analitos, tanto por volatilização como pela adsorção dos metais nos frascos.

A utilização de microsolubilizações, tanto com o uso TMAH quanto em meio de ácido fórmico, se mostraram eficientes para solubilizar as amostras de carnes e ofereceram resultados analíticos reprodutíveis e confiáveis para a determinação de Na e K em produtos a base de carne. A metodologia proposta também se apresentou como um procedimento rápido, de fácil manuseio e que utiliza pequenas quantidades de amostras e reagentes, o que vem também a diminuir de forma significativa a quantidade de resíduos gerados, contribuindo desta forma no desenvolvimento de métodos que visam atender os princípios da química verde.

O método de preparação de amostra proposto para determinação de Mg e Zn a partir da solubilização em meio de TMAH, associado ao sistema de microinjeção das amostras para determinação por F AAS, mostrou-se também uma metodologia muito simples e reprodutível, exigindo micro quantidades de amostras e reagentes, promovendo de forma eficiente a solubilização das amostras. Além disso, este método é menos suscetível à contaminação ou perdas de analito por volatilização, já que permite a mínima manipulação das amostras e se trabalha em um sistema fechado, sendo um método muito adequado para a utilização em análises de rotina. No entanto, como inconvenientes

pode-se citar o odor e alta viscosidade da solução resultante do preparo da amostra, deste modo, os procedimentos de análise devem estar bem otimizados para evitar possíveis interferências não-espectrais, quando nebulizadores pneumáticos convencionais são utilizados. Porém, como o procedimento proposto é realizado com micro quantidades de amostras, esses inconvenientes são imperceptíveis.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AgraFNP – Consultoria e Informações em Agronegócios. *The Brazilian Livestock and Meat Industry*, Relatório em Inglês, publicado em **2011**. Acessado em 15 Ago. 2011. Online. Disponível em: <http://www.informaecon-fnp.com/publicacoes/51>
- [2] Duailibi, J. “*Sem jeitinho: Exigências européias para importar carne brasileira expõem a importância de se adequar à regra do jogo*”. Outros setores já fizeram isso. Revista Veja 2050, **2008**.
- [3] Bonfim, L. M.; *Composição química e valor nutricional da carne: Minerais e Vitaminas*. Rehagro (Recursos Humanos no Agronegócio), Artigo em Português, publicado em **2003**. Acessado em 10 Ago. 2011. Online. Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=515>
- [4] Andrade, E. C. B.; Teodoro, A. J.; Takase, I.; Ciênc. Tecnol. Aliment., 27, 298,**2007**.
- [5] Correia, L. F. M.; Faraoni, A. S.; Pinheiro – Sant’Ana, H. M.; *Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas*. Alim. Nutr., Araraquara, v. 19, n. 1, p. 83-95, **2008**.
- [6] Silva, C.; Moneiro, M.L.G.; Ribeiro, R.O.R; Guimarães, C.F.M.; Mano, S.B.; Pardi, H.S.; Mársico, E.T.; *Presença de aditivos conservantes (nitrito e sulfito) em carnes bovinas moídas, comercializadas em mercados varejistas*. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, 16-1,33-36,**2009**.
- [7] Webster, J. L.; Dunford, E. K.; Hawkes, C.; Neal, B. C.; *Salt reduction initiatives around the world. Journal of Hypertension*, 29, 1043-1050, **2011**.
- [8] Ruusunen, M.; Puolanne, E. *Reducing sodium intake from meat products*. Meat Science, 70, 531–541,**2005**.
- [9] Anderson, J., Young, L.; Long, E. *Potassium and Health*, Food and Nutrition series, nº 9.355, **2008**.
- [10] Korn, M. G. A.; Boa Morte, E. S.; Santos, D. C. M. B.; Castro, J. T.; Barbosa, J. T. P.; Teixeira, A. P.; Fernandes, A. P.; Welz, B.; Santos, W. P. C.; Santos, E. B. G. N.; App. Spectrosc. Rev. 43, 67,**2008**.

- [11] Zen, S. in: *Agroanalysis.*, Revista de Agronegócio da FGV, 25: 35, **2005**.
- [12] Bliska, F. M. M. *Impactos de alterações nas exportações brasileiras de carnes sobre a economia brasileira*. Piracicaba: **1999**. 217p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- [13] Decisão da Comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho *relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados*, Jornal Oficial das Comunidades Europeias L221/8-36 de 17/08/**2002**.
- [14] Santos L.V.; Palmeira, E.M. *Exportações gaúchas de carne bovina processada para os EUA*. Revista Americana de Economia, 71, 1-12,**2006**.
- [15] Orientação sobre validação de métodos de ensaios Químicos, documento de caráter orientativo publicado pelo Instituto Nacional de Metrologias, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) em junho de **2007** (DOQ-CGCRE-008).
- [16] Mahan, L. K.; Krause, S. *Alimentos, Nutrição & Dietoterapia*. 10ª ed., Ed. Roca, São Paulo, **2002**.
- [17] Brasil. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Projeções do Agronegócio: Brasil 2010/2011 a 2020/2021, Assessoria de Gestão Estratégica*. Brasília, 58 p,**2011**.
- [18] Ordañez, J.A. *Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem animal*, Volume 2, Porto Alegre: Artmed, **2005**.
- [19] Azevedo, F. A., Chasin, A. A. M. *Metais: gerenciamento da toxicidade*. São Paulo: Editora Atheneu, **2003**.
- [20] Food Ingredients Brasil – *Dossiê: Os minerais na alimentação* – N° 4, 2008, Disponível online em: www.revista-fi.com; acessado em: 07/11/**2011**.
- [21] Lukaski, H.C. *Vitamin and mineral status: effects on physical performance*. *Nutrition*, v.20, p.632-44, **2004**.

- [22] Cozzolino, S.M.F. *Biodisponibilidade de Nutrientes*. Barueri: Ed. Manole, **2005**. Capítulo 22, p. 459.
- [23] Amorim, A.G; Tirapegui, J. *Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio*. Rev. Nutr,v.21, n.5, **2008**.
- [24] Vannucchi, H; Marchini, J. S. *Nutrição Clínica – Nutrição e Metabolismo*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2007**.
- [25] Sarno, F.; Claro, R. M.; Levy, R. B.; Bandoni, D. H.; Ferreira, S. R. G.; Monteiro, C. A. *Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2002-2003*. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 43, n. 2, abr. **2009**.
- [26] World Health Organization. *Strategies to monitor and evaluate population sodium consumption and sources of sodium in the diet*. Report of a joint technical meeting convened by WHO and Government of Canada. Canada, Oct, **2010**.
- [27] Food Ingredients Brasil – *Dossiê: Conservantes – N° 18*, **2011**, Disponível online em: www.revista-fi.com; acessado em: 02/12/2011.
- [28] Andrade, E. C. B.; Barros. A. M.; Mello, V. de S.; Takase, I. *Avaliação do teor de cobre e do zinco em carnes cruas e processadas termicamente resfriadas e congeladas no período de 1 mês*, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 24, n. 3, p. 393-396, jul./set. **2004**.
- [29] Bradley, E.M.; Williams, J.B.; Schilling, M.W; Coggins P.C., Crist, C.; Yoder, S.; Campano, S.G.; *Effects of sodium lactate and acetic acid derivatives on the quality and sensory characteristics of hot-boned pork sausage patties*; Meat science, v. 88, p. 145-150, **2011**.
- [30] Pearson, A. M. & Wolzak, A. M. *Salt - Its use in animal products - A human health dilemma*, Journal of Animal Science, 54, 1263-1278, **1982**.
- [31] Sofos, J. N. *Use of phosphates in low-sodium meat products*, Food Technology, 40, 9, 52-64, **1986**.

- [32] Guo, P., Guerrero, L., Gelabert, J., & Arnau, J. *Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented sausages and in dry-cured pork loin.* *Meat Science*, 42(1), 37–48, **1996**.
- [33] Welz, B.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, New York, **1999**.
- [34] Holler, F.J.; Skoog, D.A.; Crouch, S.R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6^o edição, Porto Alegre: Bookman, **2009**.
- [35] Amorim, F. A.C.; Lobo, I. P.; Santos, V. L. C. S.; Ferreira, S. L. C.; *Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares*, *Química Nova*, 31-7, 1784-1790, **2008**.
- [36] Okumura, F.; Cavaleiro, E.T.G.; Nóbrega, J.A. *Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica*, *Química Nova*, 27-5, 832-836, **2004**.
- [37] Krug, F.J.; Nóbrega, J.A.; Oliveira, P.V. *Espectrometria de Absorção Atômica –Parte 1 – Fundamentos e Atomização com chama*, Julho, 1-39, **2004**.
- [38] Bond, A. M., & Canterford, D. R. *Interference of lithium in atomic absorption spectrometry*, *Analytical Chemistry*, 43, 134-135, **1971**.
- [39] Sneddon, J.; Smith, M. V.; Industhy, S.; Lee, Y.; *Spectroscopy* 10, 26, **1995**.
- [40] Borges, D. L. G.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Heitmann, U. *Fundamentos de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua*. *Revista Analytica*, 18, 58-67, **2005**.
- [41] Heitmann, U.; Schütz, M.; Becker-Ross, H.; Florek, S. *Measurements on the Zeeman splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array*. *Spectrochimica Acta Part B*, 51, 1095-1105, **1996**.
- [42] Flores, E.M.M., Costa, A.B., Barin, J.S., Dressler, V.L., Paniz, J.N.G., Martins, A.F., *Direct flame solid sampling for atomic absorption spectrometry: determination of copper in bovine liver*, *Spectrochim. Acta Part B* 56, 1875–1882, **2001**.

- [43] Flores,E.M.M., Paniz,J.N.G., Martins,A.F., Muller,E.I., Costa,A.B., *Cadmium determination in biological samples by direct solid sampling flame atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy 57,2187– 2193, **2002**.
- [44] Flores,E.M.M., Paniz,J.N.G., Saidelles,A.P.F., Barin,J.S., Dressler,V.L., Muller,E.I., Costa,A.B., *Direct solid sampling by flame atomic absorption spectrometry: determination of manganese in coal samples*, Journal of the Brazilian Chemical Society, 15,199–204, **2004**.
- [45] Krug, F.J. *Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, Cap. 5, 141-156, **2010**.
- [46] Oliveira, E. *Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends*, Journal of Brazilian Chemical Society, 14, 174–182, **2003**.
- [47] Nóbrega, J. A.; Santos, M. C.; Sousa, R. A.; Cadore, S.; Barnes, R. M.; Tatro, M. *Sample preparation in alkaline media*. Spectrochimica Acta Part B, 61, 465-495,**2006**.
- [48] Ghisi, M.; Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Curtius, A. J. . *Avaliação de diferentes formas de introdução de amostra biológica tratada com hidróxido de tetrametilamônio em espectrometria atômica com chama*.Revista Analytica, 28, 58-65,**2007**.
- [49] Martins. P.; Pozebon. D.; Dressler, V.L.; Kemieciki G.A.; *Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation*, Anal. Chim. Acta. 470,195–204,**2002**.
- [50] Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J. ;Pozebon, D. *Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide*. Microchemical Journal, 64, 105-110, **2000**.
- [51] Damin, I. C. F., Silva, M. M., Vale, M. G. R., Welz, B. *Feasibility of using direct determination of cadmium and lead in fresh meat by electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes*.Spectrochimica Acta Part B, 62, 1037-1045, **2007**.
- [52] Scriver, C., Kan, M., Willie, S., Soo, C., & Birnboim, H. *Formic acid solubilization of marine biological tissues for multi-element determination by ETAAS and ICP-AES*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381,1460-1466, **2005**.

- [53] Sperling, K. R. In Fortschritte in der Atomspektrometrischen Spurenanalytik; Welz, B., ed., VCH: Weinheim, Germany, p. 385, **1984**.
- [54] Flores, É. M. M. ; Saidelles, A. P. F. ; Barin, J. S. ; Mortari, S. R. ; Martins, A. F. . *Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry*. J Anal At Spectrom, v. 16, p. 1-6, **2001**.
- [55] Mortari, S. ; Saidelles, A. P. F. ; Barin, J. S. ; Flores, É. M. M. ; Martins, A. F. . *A simple procedure for decomposition of human hair using polypropylene vials for selenium determination by hydride generation atomic absorption spectrometry*. Mikrochimica Acta (1966. Print), v. 148, p. 157-162, **2004**.
- [56] Marcó, L. M; Capote, T.; Hernández, C.; Greaves, E. D.; Feasibility study on in situ microwave digestion prior to analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence. Spectrochim. Acta, 56B, 2187-2193, **2001**.
- [57] Campos, R.C.; Vegueria, S. F. J; Gonçalves, R. A.; Wagener, A. L. R.; *A Microdigestion Procedure Directly Performed in the Autosampler Cups for the Determination of Trace Elements in Biological Samples by GF AAS*, J. Braz. Chem. Soc., vol. 20 n°10, 1925-1930, São Paulo, **2009**.
- [58] Rosini, F.; Nascentes, C. C.; Nóbrega, J. A.; *Experimentos Didáticos Envolvendo Radiação Microondas*; Quim. Nova, 27, 1012, **2004**.
- [59] Casada, Mark E.; Walton, Linus R.; Swetnam, Larry D. e Casada, James H., *Moisture content as a function of temperature rise under microwave radiation. Transactions of the ASAE*, p. 907-91, **1983**.
- [60] Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, *Regras para análise de sementes*, Brasília, p. 365, **1992**.
- [61] Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Método para análise de microelementos por GF AAS*, N° 400/03, emissão 1985, revisão **2005**.
- [62] Sebranek, J. G. *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*, Chapter 1, 6-21, **2009**.

[63]ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm, acessado em: dezembro/2011.

[64] Dantas, A.; Notícia do dia 10/04/**2011** do site da Folha Paulista: Governo e indústria firmam acordo para redução de sal em alimentos, Disponível em: <http://www.afolha.com.br/noticias.php?noticia=1994>, acessado em: dezembro/2011.

[65] Mistura, L. P. F., Colli, C. *Efeito da irradiação e processo térmico na concentração do ferro heme e nas propriedades da cor da carne. Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29 (1), 195-199.**2009**.

[66] Nunes, A. M.; Acunha, T. S.; Oreste, E. Q.; Lepri, F. G.; Vieira, M. A.; Curtius, A. J.; Ribeiro, A. S.; *Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium by Atomic Absorption Spectrometry*. Journal Braz. Chem. Soc., São Paulo, vol. 22, n° 10, p. 1850-1857, **2011**.