



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ERIK GALVÃO PARANHOS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE COBRE, MANGANÊS E ZINCO EM
AMOSTRAS DE CHOCOLATE EM PÓ UTILIZANDO
AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA
MULTIELEMENTAR SEQUENCIAL**

Salvador

2006

ERIK GALVÃO PARANHOS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE COBRE, MANGANÊS E ZINCO EM
AMOSTRAS DE CHOCOLATE EM PÓ UTILIZANDO
AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA
MULTIELEMENTAR SEQUENCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Salvador

2006

Silva, Erik Galvão Paranhos da

Determinação de metais em amostras de chocolate em pó utilizando amostragem de suspensão e detecção por espectrometria de absorção atômica em chama multielementar seqüencial. / Erik Galvão Paranhos da Silva. – Salvador, 2006.

121 f.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2006.

1. Chocolate - Determinação de metais. 2. FAAS - Multielementar seqüencial. 3. Cobre. 4. Manganês. 5. Zinco. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. II. Ferreira, Sérgio Luis Costa. III. Título.

CDU: 543.621: 663.91

A minha mãe Zayra e irmã Francys por todo o amor e dedicação

A minha noiva Jamille e meu filho João pelo carinho e compreensão

A toda minha família pelo incentivo

AGRADECIMENTOS

Ao bom **Deus**, por ter colocado as pessoas nos momentos certos em minha vida.

Aos meus familiares **Clementino, Lipinha, Ilka, Selma, Elke, Caio, Joana, Roque, Cabral, Walkíria e Elaine** pelo incentivo e certeza no meu sucesso.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira** por ter confiado na minha capacidade em realizar este trabalho, amizade, paciência, disponibilidade e brilhante orientação.

Aos **Profs. Dr. Antônio Celso Spínola Costa e Dra. Maria das Graças Andrade Korn**, pelos bons momentos e valiosas conversas.

Aqueles que tão bem me receberam na república **Isley** (sempre atenciosa), **Luciano** (sempre disposto a ajudar) e **Fábio Alan** (pela amizade e preciosa ajuda em Analítica na república). Minha admiração e amizade por vocês o tempo só fortalece. A **Giovani** pela experiência, conselhos e companhia.

Aos companheiros do Grupo de Pesquisa em Química Analítica: **Fábio Dias, Rennan, Lindomar, Ana Carolina, Pedro, Geovani, Elane, Ivon, Maribel, Wagna, Letícia, André, Sérgio Rocha (dog), Denílson, Elecy, Jacira, Márcia, Ana Pinto, Neyla, Daniele, Christiane, Daniel, Márcia** em especial a **Walter, Anderson, Hadla, Marcos Bezerra e Marcelo** pela imprescindível ajuda e socorro nos momentos difíceis.

A **Profa. Nádia e Raigenis** por contribuírem realizando as análises das amostras no Microscópio Eletrônico.

Aos funcionários que facilitam nossa vida especialmente **Cristóvão, Paulo e Alice**.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho **Muito Obrigado!**

*As pessoas influenciam-nos,
As vozes comovem-nos,
Os livros convencem-nos,
Os feitos entusiasmam-nos.*

John Henry Newman

RESUMO

Fungicidas cúpricos aplicados às lavouras cacauceiras comprometem a qualidade de seus derivados, os quais são amplamente consumidos por grande parte da população mundial. No presente trabalho foram desenvolvidos métodos simples e de baixo custo para determinação de cobre, manganês e zinco em amostras de chocolate em pó utilizando espectrometria de absorção atômica em chama multielementar seqüencial. A utilização da amostragem de suspensões e banho ultrasônico da amostra permitiu a determinação direta dos referidos elementos em chocolate em nível de traços, eliminando a necessidade de pré-tratamento da amostra.

Após otimização, os parâmetros experimentais estabelecidos foram: diâmetro das partículas (4 a 23 μm), concentração do ácido HCl (1 a 4 mol.L^{-1} para cobre) e HNO_3 (1 a 4 mol.L^{-1} para manganês e zinco), tempo de sonicação (0 a 20 min) e massa da amostra (50 a 400 mg).

Os limites de detecção obtidos foram 400, 52 e 61 ng.g^{-1} , e de quantificação 0,13, 0,17 e 0,20 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente para cobre, manganês e zinco.

A repetibilidade ($n=10$) obtida foi de 2,5%, 2,6% e 3,2%, para cobre, manganês e zinco para uma amostra de chocolate contendo de 31,5, 52,7 e 101,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente.

A exatidão do método foi confirmada por análise dos materiais de referência certificados farinha de arroz NIST SRM 1568a e farinha de arroz NIES CRM 10-b. O método proposto foi aplicado para a determinação de cobre, manganês e zinco em seis amostras de chocolate em pó cujas concentrações encontradas variaram de 25,8 a 48,7; 41,1 a 52,7 e 83,3 a 102,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Suspensão, FAAS, chocolate, cobre, manganês e zinco.

ABSTRACT

Cupric fungicides used in the farming cocoa compromise quality of your derived, extensively consumed by world population. In this work, simple and low cost method was develop for determination of copper, manganese and zinc in powdered chocolate samples using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. Slurry-sampling and ultrasonic bath allowed direct determination of elements in chocolate at trace level, removing pre-treatment of the sample.

After optimization the established experimental parameters were particles size (4 to 23 μm), concentration HCl (1 to 4 mol.L^{-1} for copper) and HNO_3 (1 to 4 mol.L^{-1} for manganese and zinc), sonication time (0 to 20 min) and sample mass (50 to 400 mg).

The detection limits obtained were 0,4, 0,05 and 0,06 $\mu\text{g.g}^{-1}$, and quantification 0,13, 0,17 and 0,20 $\mu\text{g.g}^{-1}$, for copper, manganese and zinc respectively.

Precision for (n = 10) obtained were 2,5%, 2,6% e 3,2%, for copper, manganese and zinc with concentrations 31,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 52,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 101,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectively.

The accuracy of proposed method was confirmed using certified reference materials NIST SRM 1568a rice flour and NIES CRM 10-b rice flour. The proposed method was applied for determination of copper, manganese and zinc in six samples of powdered chocolate samples and the content varied from 25,8 to 48,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 41,1 to 52,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ and 83,3 to 102,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectively.

Keywords: Slurry, FAAS, chocolate, copper, manganese and zinc.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cacaueiro.....	18
Figura 2- Cacau infectado pelo fungo da podridão parda	21
Figura 3- Galhos do cacaueiro quando atacados pelo fungo ficam com o aspecto de uma “vassoura”	22
Figura 4- Cacau atacado pelo fungo, apresentando alguns frutos em um estágio avançado da doença	22
Figura 5- Configuração óptica de um espectrômetro de absorção atômica seqüencial com atomização em chama.....	51
Figura 6- Esquema de um queimador de pré-mistura	54
Figura 7- Desenho esquemático de um microscópio eletrônico de varredura.....	58
Figura 8- Visão geral do aglomerado	61
Figura 9- Maior diâmetro de partícula encontrado nas amostras	62
Figura 10- Menor diâmetro de partícula encontrado nas amostras	62
Figura 11- Sinais de absorvância de HCl e HNO ₃ em diferentes concentrações. Condições: Sonicação de 20 min; 150 mg de amostra	64
Figura 12- Influência do tempo de sonicação no sinal analítico. Condições: HCl 2,0 mol.L ⁻¹ ; 150 mg de amostra.....	65
Figura 13- Extensão aplicada para desvio da inclinação. Condições: HCl 2,0 mol.L ⁻¹ ; sonicação de 15 min	66
Figura 14- Curva analítica utilizando soluções de Cu ²⁺ em meio de HCl 2,0 mol.L ⁻¹	67
Figura 15- Curva analítica com adição de analito no chocolate	67
Figura 16- Curva analítica com adição de analito na farinha de arroz	68
Figura 17- Efeitos estimados para o manganês	75

Figura 18- Efeitos estimados para o zinco	76
Figura 19- Sinais de absorvância de HCl e HNO ₃ em diferentes concentrações para o Mn. Condições: sonicação de 15 min; 200 mg de amostra	77
Figura 20- Sinais de absorvância de HCl e HNO ₃ em diferentes concentrações para Zn. Condições: sonicação de 15 min; massa de 200 mg	77
Figura 21- Influência do tempo de sonicação no sinal analítico para o Mn. Condições: HNO ₃ 2,0 mol.L ⁻¹ ; 200 mg de amostra.....	78
Figura 22- Influência do tempo de sonicação no sinal analítico para o Zn. Condições: HNO ₃ 2,0 mol.L ⁻¹ ; 200 mg de amostra	79
Figura 23- Extensão aplicada para desvio da inclinação para o Mn. Condições: HCl 2,0 mol.L ⁻¹ ; sonicação de 15 min.....	80
Figura 24- Extensão aplicada para desvio da inclinação para o Zn. Condições: HCl 2,0 mol.L ⁻¹ ; tempo de sonicação 15 min.....	80
Figura 25- Distribuição de cobre nas amostras de chocolate.....	86
Figura 26- Distribuição de zinco nas amostras de chocolate	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alguns trabalhos encontrados na literatura sobre determinação de metais em amostras de chocolate	20
Tabela 2 - IDR em diferentes grupos populacionais.....	33
Tabela 3 - Aplicações da amostragem de suspensão na análise de alimentos	35
Tabela 4- Parâmetros operacionais do FAAS	54
Tabela 5- Variáveis e intervalos estudados.....	63
Tabela 6- Comparação entre equações de calibração para os métodos de calibração obtidos.....	68
Tabela 7- Valores obtidos para determinação de Cu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em amostras certificadas e em amostras de chocolate em pó comercial (n = 3).....	72
Tabela 8- Parâmetros operacionais do GF AAS	72
Tabela 9- Análise de variância das concentrações obtidas para o cobre.....	73
Tabela 10- Variáveis e níveis estudados.....	74
Tabela 11- Matriz de planejamento 2^3 e respectivas absorvâncias.....	75
Tabela 12- Curvas analíticas obtidas com diferentes técnicas de calibração	82
Tabela 13- Valores obtidos para determinação de Mn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na amostra certificada e em amostras de chocolate em pó comercial (n = 3).....	83
Tabela 14- Valores obtidos para determinação de Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na amostra certificada e em amostras de chocolate em pó comercial (n = 3).....	84
Tabela 15- Análise de variância das concentrações obtidos para o manganês e o zinco	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Absorção Atômica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B	Coefficiente angular de um gráfico de regressão linear
BIFF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno sobre a chama e injeção em feixe
CEPLAC	Comissão Executiva de Planos da Lavoura Cacaueira
CV AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio
ETA-LEAFS	Espectrometria de fluorescência atômica com atomização eletrotérmica excitada por laser
ETV-ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e atomização eletrotérmica
ETV-ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e atomização eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica em chama
FETV-ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e vaporização eletrotérmica por fluorinação
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
HG AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos
HG AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
IDR	Ingestão Diária Recomendada

LA ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e ablação por laser
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MIP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por microondas
TF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de tungstênio
TS-FF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno sobre a chama e geração do aerossol térmico
RSD	Desvio Padrão Relativo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 2 - O CHOCOLATE	17
2.1- HISTÓRIA	17
2.2 - O ALIMENTO CHOCOLATE	19
2.3 - PRINCIPAIS DOENÇAS DA CACAUCULTURA	20
2.3.1 - <i>Podridão parda</i>	20
2.3.2 - <i>Vassoura de bruxa</i>	22
2.4 - FUNGICIDAS CÚPRICOS EM PLANTAÇÕES DE CACAU	23
CAPÍTULO 3 - AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO	25
3.1- INTRODUÇÃO	25
3.2 - PREPARO DAS SUSPENSÕES	26
3.3 - PRINCIPAIS VARIÁVEIS NO PREPARO DAS SUSPENSÕES	26
3.3.1 - <i>Diâmetro da partícula</i>	26
3.3.2 - <i>Concentração da suspensão</i>	27
3.3.3 - <i>Meio líquido</i>	28
3.3.4 - <i>Partição do analito</i>	28
3.3.5 - <i>Sistemas de homogeneização</i>	29
3.3.5.1 - <i>Agitação manual</i>	29
3.3.5.2 - <i>Agitação mecânica</i>	30
3.3.5.3 - <i>Agitação magnética</i>	30
3.3.5.4 - <i>Borbulhamento de gás</i>	30
3.3.5.5 - <i>Homogeneização ultrasônica</i>	31
3.3.6 - <i>Agentes estabilizantes</i>	31
3.3.7 - <i>Modificadores químicos</i>	32
3.4 - APLICAÇÃO DA AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO NA ANÁLISE DE ALIMENTOS	32
CAPÍTULO 4 - EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR COBRE, MANGANÊS E ZINCO	47
4.1 - COBRE	47

4.1.1 - <i>Essencialidade e Toxicidade</i>	47
4.2 - MANGANÊS	48
4.2.1 - <i>Essencialidade e Toxicidade</i>	48
4.3- ZINCO	48
4.3.1 - <i>Essencialidade e Toxicidade</i>	49
CAPÍTULO 5 - ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA MULTI-ELEMENTAR	50
5.1 - EVOLUÇÃO DA TÉCNICA	50
5.2 - ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA SEQUENCIAL	51
CAPÍTULO 6 - PARTE EXPERIMENTAL	53
6.1 - INSTRUMENTAÇÃO	53
6.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES	55
6.3 - AMOSTRAS	56
6.4 - PREPARO DAS AMOSTRAS	56
6.5 - DIGESTÃO POR VIA ÚMIDA	56
6.5.1 - <i>Digestão ácida em sistema aberto</i>	57
6.5.2 - <i>Digestão ácida em sistema fechado</i>	57
6.6 - DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS	57
6.7 - DETERMINAÇÃO DA UMIDADE	58
6.8 - CURVAS ANALÍTICAS	59
6.9 - OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA	59
CAPÍTULO 7 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
7.1 - DETERMINAÇÃO DE COBRE UTILIZANDO AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA	61
7.1.1 - <i>Determinação do diâmetro das partículas</i>	61
7.1.2 - <i>Variáveis estudadas</i>	63
7.1.2.1- <i>Tipo e concentração do ácido</i>	63
7.1.2.2 - <i>Estudo do tempo de sonicação</i>	64
7.1.2.3 - <i>Massa de amostra</i>	65
7.1.3 - <i>Procedimento de calibração</i>	66
7.1.4 - <i>Validação do método</i>	69
7.1.4.1 - <i>Limite de detecção e quantificação (LD e LQ)</i>	69

7.1.4.2 - Aplicabilidade do método	70
7.1.4.3 - Precisão	70
7.1.4.4 - Estimativa da exatidão	71
7.1.5 - <i>Testes complementares</i>	73
7.2 - DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS E ZINCO UTILIZANDO AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA MULTIELEMENTAR SEQUÊNCIAL	74
7.2.1 - <i>Otimização das variáveis</i>	74
7.2.1.2 - Tipo e concentração do ácido	76
7.2.1.3 - Estudo do tempo de sonicação	78
7.2.1.4 - Massa da amostra.....	79
7.2.2 - <i>Procedimento de calibração</i>	81
7.2.3 - <i>Validação do método</i>	82
7.2.3.1 - Limite de Detecção e Quantificação	82
7.2.3.2 - Precisão	83
7.2.3.3 - Estimativa da exatidão	83
7.2.4 - <i>Testes complementares</i>	84
7.2.5 - <i>Avaliação dos resultados</i>	85
CAPÍTULO 8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS.....	110

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

O crescimento tecnológico e industrial tem aumentado sobremaneira o volume de resíduos gerados, influenciando negativamente o meio ambiente. Substâncias tóxicas são utilizadas no controle de pragas nas lavouras para aumentar a produtividade e, portanto, os lucros, muitas vezes sem nenhuma preocupação ambiental, causando efeitos devastadores sobre ecossistemas.

Neste quadro, a lavoura cacaeira tem sofrido com anos de aplicação de fungicidas à base de cobre para controlar doenças típicas da microrregião na qual se insere. A clonagem do cacau, mesmo que cresça em uso, não substituirá o uso do fungicida. Tais aplicações não contaminam somente o vegetal, mas também o solo e águas subterrâneas de lençóis freáticos, contaminando também todo o ecossistema ao redor.

Em função disto, estudos analíticos mais aprofundados devem ser realizados tendo em vista a necessidade do monitoramento ambiental rápido e efetivo, com a implementação de novas técnicas e processos analíticos que objetivem a simplificação das análises, tais como a amostragem de suspensão que se caracteriza por diminuição de custos, rapidez, menor participação humana e manipulação das amostras.

A espectrometria de absorção atômica com chama é uma técnica bem estabelecida e suficientemente seletiva e sensível para a determinação de metais e acessível a maioria dos laboratórios. Recentes avanços têm permitido determinações multielementares de forma seqüencial, aumentando as vantagens da técnica.

Pode-se concluir então a necessidade de monitoramento ambiental eficiente com sua correta administração nos mais diferentes ecossistemas. Desta forma, surge então como principal objetivo deste trabalho a agregação de valor nutricional a alimentos, bem como o desenvolvimento de métodos que pudessem ser utilizados de forma rotineira em laboratórios e indústrias, caracterizando-se como ferramenta analítica.

CAPÍTULO 2 O CHOCOLATE

2.1- HISTÓRIA

A história do chocolate é muito antiga tendo pelo menos 3000 anos, começando com as civilizações Asteca e Maia na América Central onde hoje se localizam os territórios de México e Guatemala. De acordo com uma antiga lenda mexicana, Quetzalcoatl, Deus Asteca da sabedoria presenteou seu povo com sementes de cacau, trazidas das terras do filho do Sol. Desde então o cacau assumiu uma posição muito importante na vida dos Astecas, Toltecas e Incas, que lhe atribuíram poderes mágicos. Os Maias, por volta de 600 a.C. foram os primeiros a cultivar as sementes de cacau e os grãos eram muito utilizados em uma bebida chamada *tchocolath* onde, segundo a receita primitiva, era preparada secando-se as sementes que eram então torradas e trituradas, adicionava-se água, mel, farinha de milho e especiarias tendo como resultado um líquido escuro tratado como precioso. Os Astecas chegaram a usá-las como moeda de troca em transações comerciais. Admite-se que os Astecas foram os primeiros chocólatras conhecidos da história, chegando a fazerem infusão por acreditarem ter poder afrodisíaco. O imperador Asteca Montezuma chegava a beber mais de 50 porções por dia e cuidava sempre de tomar uma dose extra antes de ir para o seu harém [1,2].

Em 1492 as sementes do cacau chegam à Europa pelas mãos de Cristóvão Colombo, mas só em 1528 é que o chocolate se populariza na corte sendo sua produção mantida em segredo por mais de meio século [1].

A primeira fábrica de chocolate surgiu na Inglaterra em 1657 e por volta de 1730 já era acessível a grande parte da população, sendo consumido exclusivamente de forma líquida. Em 1828 o químico holandês *Coenrad van Houten* patenteou um processo para fabricar chocolate em pó, que consistia em diminuir o teor de manteiga de cacau, fazendo com que o pó se dissolvesse mais facilmente em água. Em 1849 a firma Joseph Fry & Sons apresentou o primeiro chocolate em tabletes e apenas em 1876 na suíça, “o *chocolatier*” Daniel Peter desenvolveu a

técnica de adição de leite ao chocolate, criando o produto final que consumimos até hoje [3,4].

Em meados do século XVIII o cacaveiro (Figura 1) começou a ser cultivado em fazendas do sul da Bahia, inicialmente como planta ornamental, onde encontrou um ambiente extremamente favorável a ponto de fazer do Brasil um dos grandes produtores mundiais da fruta. Na primeira metade do século XIX o cacaveiro foi introduzido em colônias européias na África e hoje cerca de três quartos do cacau fornecido as indústrias de chocolate são cultivadas na África Ocidental.

Em 1753 o botânico sueco Carlos Linneu deu ao cacaveiro o nome científico de *Theobroma cacao* L., que do grego significa “alimento divino”, consagrando crenças antigas [1].

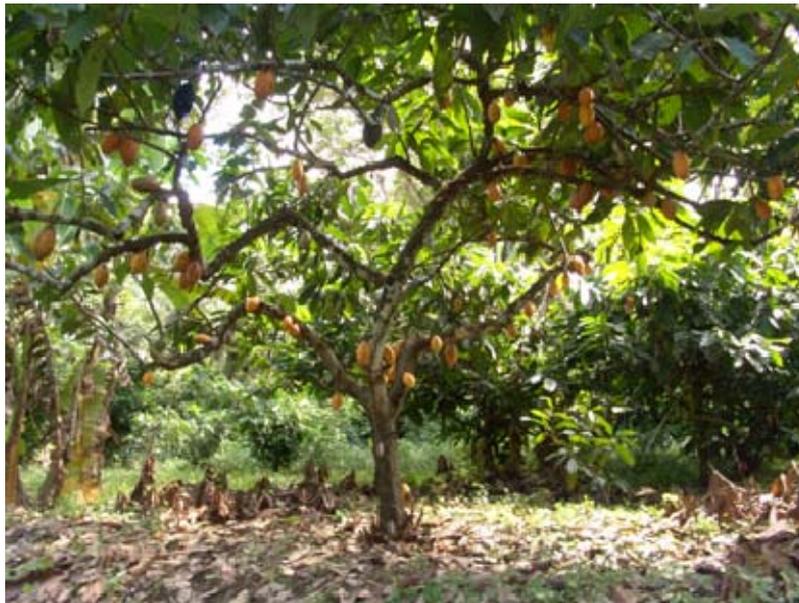


Figura 1- Cacaveiro.

2.2 - O ALIMENTO CHOCOLATE

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão subordinado ao Ministério da Saúde, estabelece os padrões de identidade e qualidade para os alimentos comercializados no Brasil. A Resolução CNNPA nº12, de 1978 estabelece parâmetros de classificação de controle de qualidade para o chocolate (Anexo A).

O chocolate é um dos alimentos mais completos já produzidos pelo homem, no entanto, não é recomendável como alimento isolado salvo em situações específicas e sob acompanhamento médico como, por exemplo, atletas, pilotos, soldados e navegadores que se valem dele como complemento alimentar. O chocolate tem efeito relaxante no organismo devido à ação da *theobromina*, alcalóide presente que auxilia na melhora das reações em situação de tensão, possuindo também efeitos diurético e laxante. Também possui fenóis (chocolate preto), que auxiliam na eliminação do mau colesterol, pois o estresse está relacionado com uma baixa taxa de eliminação de toxinas [4].

Dispensa aditivos e conservantes visto que a gordura nele contida não oxida facilmente, aliado ao baixo teor de água, chega a ter durabilidade de um ano sob as condições de armazenagem de alimentos (local seco e arejado ao abrigo da luz). A gordura presente no cacau, também chamada de manteiga, dá ao chocolate sua textura e sabor característico, mas esta gordura não aumenta os níveis de colesterol.

O chocolate contém nutrientes essenciais tidos como afrodisíacos que fornecem ao organismo energia, bom humor e prevenção da insônia, causando bem estar característico. Problemas de pele como cravos e espinhas nada têm em comum com o consumo do chocolate. Fisiologicamente, não apresenta nenhuma ameaça a saúde quando ingerido com moderação.

É um ingrediente muito usado na preparação de alguns alimentos (como biscoitos, bolos, sorvetes etc), sendo bastante consumido principalmente por crianças assim, a quantidade de minerais essenciais e tóxicos presentes têm grande importância no controle nutricional.

A partir do acima exposto, percebe-se a importância do desenvolvimento de métodos analíticos aplicados à determinação de metais em amostras de chocolate

em pó. Poucos são os trabalhos encontrados na literatura para determinação de metais na referida amostra, alguns dos quais se encontram na Tabela 1.

Tabela 1- Alguns trabalhos encontrados na literatura sobre determinação de metais em amostras de chocolate

Elementos	Metodologia	Técnica analítica	Referência
Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni e Pb	Amostragem de suspensão	ET AAS	[5]
Cu	Amostragem de suspensão	FAAS	[6]
Al	Digestão ácida	ET AAS	[7]
Ni, Fe e Cu	Digestão ácida	FAAS	[8]
Pb	Digestão ácida	ICP MS	[9]

2.3 - PRINCIPAIS DOENÇAS DA CACAUICULTURA

Existem muitas doenças relacionadas à cacauicultura nas quais duas destacam-se por representarem juntas mais da metade das perdas na produção em quase todas as regiões produtoras de cacau, são elas a Podridão Parda, também conhecida na região sul da Bahia como “mela” e a Vassoura de Bruxa.

2.3.1 - Podridão parda

No final da década de 40 surge nas fazendas do sul da Bahia a podridão parda, causada pelo fungo *Phytophthora spp* (Figura 2). O aparecimento da doença está relacionado com a alta umidade relativa do ar na região 85% e temperaturas mais baixas nos meses mais frios do ano (em torno de 20°C) mais ainda, a incidência da podridão parda era diretamente proporcional ao número de frutos por planta e a ocorrência de chuvas, ou seja, o micro-clima característico da região exercia um papel de grande destaque para a ocorrência de surtos da doença [10]. Para que a epidemia alcance seu pico máximo, são requeridos normalmente de três a cinco meses.



Figura 2- Cacao infectado pelo fungo da podridão parda.

Um dos primeiros sintomas da podridão-parda vistos aproximadamente 30 h após a infecção, é o aparecimento de pequenas manchas na superfície dos frutos, sob condições de alta umidade. As lesões desenvolvem-se rapidamente e escurecem assumindo a coloração castanha característica, podendo atingir toda a superfície do fruto entre 10 a 14 dias [11]. A infecção pode ocorrer em qualquer local da superfície do fruto e em qualquer fase do seu desenvolvimento.

As estratégias de controle para a podridão-parda baseiam-se, principalmente, em medidas envolvendo o uso de fungicidas protetores, principalmente, os à base de cobre, além do emprego de práticas culturais como: remoção de frutos infectados, colheitas freqüentes, além da redução no sombreamento, poda e drenagem do solo, visando tornar o ambiente desfavorável à doença. No Brasil, as primeiras tentativas de controle químico da podridão-parda tiveram início nos anos 50. Desde então, fungicidas à base de cobre vêm sendo utilizados de forma bem sucedida, embora existam relatos de uso insatisfatórios em outros países, onde muitas vezes, são requeridas até doze aplicações, ao ano, para se ter um controle, sendo que atualmente estes fungicidas são as formas mais utilizadas de controle. Outras formulações têm sido propostas visando a não utilização com muita intensidade dos fungicidas à base de cobre as quais não são tão eficientes além de requererem maiores quantidades e gerando outros resíduos, mas ainda se encontram em fase de preliminar de estudos.

Resistência genética seria outra importante alternativa de controle para a podridão-parda, não fossem as dificuldades encontradas na seleção de materiais resistentes pela existência de mais de uma espécie de *Phytophthora* causando a doença no Brasil. Dezenove outros fungicidas mostraram resistência ora a uma ou duas espécies, mas não as três, podendo ainda assim ser utilizados em programas de melhoramento genético visando resistência às doenças do cacaueteiro.

2.3.2 - Vassoura de bruxa

A vassoura-de-bruxa (VB) é uma das mais importantes e destrutivas doenças do cacaueteiro, chegando a causar perdas de até 90% na produção. A doença foi descoberta pela primeira vez no Suriname, embora ocorresse na região Amazônica desde o século XIX, além de estar presente em diversos países da América do Sul e Central como: Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela, Trinidad e Tobago, só foram constatados na principal região produtora de cacau do Brasil, o sul da Bahia, em 1989 onde encontrou condições ambientais favoráveis, disseminando-se rapidamente, provocando um virtual colapso na economia regional.

A doença é causada pelo fungo *Crinipelis perniciosa*, que provoca amarelecimento precoce, deformação do fruto e lesões externas [12]. Os danos internos em frutos são mais pronunciados que os da podridão-parda, com as amêndoas, na maioria das vezes, apresentando-se completamente danificadas, e em fase mais avançada, com crescimento do fungo na sua superfície (Figuras 3 e 4).



Figura 3- Galhos do cacaueteiro quando atacados pelo fungo ficam com o aspecto de uma "vassoura".



Figura 4- Cacau atacado pelo fungo, apresentando alguns frutos em um estágio avançado da doença.

A principal forma de disseminação da doença é pelo ar, embora a chuva não deixe de exercer também um importante papel. Após a infecção dos tecidos observa-se a formação de brotações hipertrofiadas e excessiva proliferação de brotos, comumente denominada de vassouras verdes. A utilização de materiais genéticos resistentes é considerada a solução mais econômica e desejável, resultados obtidos no passado, nem sempre foram consistentes com determinados materiais ora comportando-se como resistentes em alguns países, e susceptíveis em outros. Esforços recentes visando à seleção de novos materiais têm sido intensificados, o que vem proporcionando esperança na busca de soluções mais duradouras para o problema. Experimentos avaliando fungicidas à base de enxofre mostraram-se inconclusivos. Atualmente, dos produtos à base de cobre apenas o óxido cuproso é recomendado, pois foi o que apresentou maior número de resultados positivos, em condições de campo, sendo aplicado sob a forma de cobre metálico, comprado com o nome de Cobre Sandoz®, o qual possui em sua formulação 50 % de cobre metálico. A clonagem tem sido bastante empregada e diversos clones apresentam bons níveis de resistência, inclusive existe na região sul da Bahia uma biofábrica de cacau que produz o clone resistente à doença, o qual é disponibilizado aos produtores rurais, no entanto, o óxido cuproso ainda é recomendado para as doenças mencionadas.

2.4 - FUNGICIDAS CÚPRICOS EM PLANTAÇÕES DE CACAU

As sementes de cacau produzidas no Brasil enfrentam diversas restrições na sua comercialização devido a problemas de qualidade. Estas restrições são ocasionadas, principalmente pela presença de impurezas, cheiros diversos especialmente de fumaça, além de metais pesados em níveis acima dos limites toleráveis. Desses metais, cobre é o que mais preocupa devido ao seu uso comum através de pulverizações no controle de doenças em grande número de plantas cultivadas. No controle da podridão parda, os fungicidas cúpricos fazem parte do “pacote tecnológico” recomendado para esse cultivo, sendo uma prática habitual sua pulverização [13].

O fungicida é aplicado através de pulverização na copa e no fruto. O cobre forma uma espécie de “película protetora”, impedindo que os esporos da doença penetrem diretamente pela casca do fruto. Não ocorre contaminação direta através do fruto, a contaminação ocorre com as chuvas e queda normal das folhas quando o cobre é lixiviado para o solo, que lentamente se acumula através dos anos, especialmente nas camadas mais superficiais [14]. A planta absorve esse elemento em excesso, alterando sua constituição mineral, e conseqüentemente, a absorção de outros elementos para manter o equilíbrio mineral. É reportado na literatura que fósforo, manganês e zinco associados à acidez, argila e matéria orgânica sofrem alteração de sua constituição no cacaueteiro [15,16,17].

Até 1983 a CEPLAC (Comissão Executiva de Planos da Lavoura Cacaueira, órgão do governo federal) recomenda para produtores da região três ou mais aplicações por ano na dosagem de 2,4 Kg de cobre metálico/ha/aplicação visando o controle da podridão parda [16]. A partir da constatação da vassoura de bruxa, as dosagens recomendadas passaram a ser maiores com seis aplicações/ano de 3 g de cobre metálico por planta a intervalo mensal ou três aplicações/ano de 6 gramas de cobre metálico por planta a intervalo bimestral [17]. Foram encontrados teores de cobre extremamente elevados em solos de cacauais tratados com cobre durante cinco a dezesseis anos, quando comparados com teores em solos similares de áreas isentas de aplicação com fungicidas cúpricos [18].

CAPÍTULO 3

AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO

3.1- INTRODUÇÃO

Grande parte dos procedimentos realizados para determinação de elementos empregando a espectroscopia atômica - absorção e/ou emissão - necessitam de técnicas para decomposição da matriz e conversão em solução aquosa para posterior determinação do analito. Essas técnicas envolvem etapas sujeitas a problemas, principalmente a etapa de pré-tratamento, como perda de analitos voláteis, contaminação, além de serem normalmente longas, sendo que esta etapa consome cerca de 61 % do tempo total para a análise e é responsável por cerca de 30 % do erro total [19]. Desta forma, métodos que minimizem ou mesmo contornem a etapa de pré-tratamento têm sido desenvolvidos visando à introdução das amostras diretamente nos equipamentos de absorção/emissão atômica.

Nas últimas décadas, estratégias analíticas têm sido propostas para análise direta de amostras sólidas [20,21] as quais encontram problemas relacionados a heterogeneidade das amostras em pequenas massas e dificuldades quanto à calibração, devido a pouca disponibilidade de padrões sólidos. A técnica de amostragem de suspensão surge então como alternativa [22,23] proposta por Brady et al. [24,25], possuindo as vantagens da amostragem de sólidos e líquidos. Apresenta vantagens tais como a simplificação da etapa de pré-tratamento da amostra diminuindo o tempo de análise e trabalho operacional, minimiza a perda de analitos voláteis e contaminação da amostra, além de diminuir custos e o consumo de reagentes perigosos e corrosivos, permitindo ainda o uso de padrões aquosos e/ou métodos de adição de analito para calibração, sendo aplicável a amostras orgânicas e inorgânicas [26]. Como toda técnica possui algumas desvantagens como homogeneidade e sua conseqüente manutenção no momento da detecção e também o tamanho da partícula, sendo o fator mais crítico relacionado ao preparo das suspensões.

Na maior parte dos trabalhos publicados envolvendo a amostragem de suspensão foram utilizados os equipamentos de absorção atômica com atomização

eletrotérmica (GF AAS) para detecção dos analitos, devido à facilidade de introdução das amostras no forno de grafite, comparada com os aparelhos que utilizam a chama como forma de atomização (FAAS), devido à presença do nebulizador, problemas estes contornados com a introdução no mercado de nebulizadores especiais desenvolvidos por pesquisadores cujo desenho foi primeiramente desenvolvido por Babington [27.-30], minimizando problemas de transporte das partículas sólidas.

3.2 - PREPARO DAS SUSPENSÕES

O preparo de uma suspensão consiste em triturar o sólido, se necessário peneirar, adicionar o diluente para formar a suspensão a qual deve ter o sólido igualmente distribuído no meio durante o tempo necessário para realização da medida analítica. Assim, a quantidade de sólido utilizado para a análise é diretamente dependente da concentração do analito que se deseja determinar, bem como a diluição final da suspensão [31]

3.3 - PRINCIPAIS VARIÁVEIS NO PREPARO DAS SUSPENSÕES

No preparo das suspensões devem-se levar em conta alguns fatores que influenciarão diretamente nos resultados obtidos a saber, diâmetro da partícula, razão massa/volume, meio líquido, partição do analito, sistemas de homogeneização, agentes estabilizantes e modificadores [22].

3.3.1 - Diâmetro da partícula

Fator mais crítico relacionado ao preparo das suspensões influencia diretamente a estabilidade da suspensão, em termos da velocidade com que a partícula sedimenta, bem como processo de transporte e, conseqüentemente, a atomização, prejudicando a precisão e exatidão das análises [32]. Não é um fator tão crítico para GF AAS devido ao sistema de introdução da amostra do que para

FAAS e ICP pela presença do nebulizador e menor tempo de residência da partícula sólida no atomizador.

Diâmetros grandes das partículas prejudicam a repetibilidade devido à perda de homogeneidade, estabilidade e representatividade da alíquota injetada, sendo necessária então moagem da amostra para redução do diâmetro [33], como por exemplo, almofariz de porcelana, moinho de bolas e moagem criogênica além de uma variedade dessas técnicas confeccionadas com outros elementos devido a problemas de contaminação ou por serem mais indicadas para matrizes específicas são os mais utilizados [34]. A principal desvantagem destas etapas é a possibilidade de contaminação, aumento do tempo e eventualmente peneiração. A recomendação geral é que se deve trabalhar com amostras cujo diâmetro das partículas seja menores que 50 μm [35], sendo que diâmetros iguais ou superiores a 500 μm podem ser utilizados, a depender do sistema de introdução da amostra (no caso do GF AAS). É reportado na literatura que o uso de tamanhos de partícula muito pequenos (10 a 20 μm) é requerido para amostras cujos elementos de interesse não estejam homogeneamente distribuídos em sua extensão [36], pois influenciam diretamente a calibração do sistema, melhorando também a precisão dos resultados analíticos, aumentando a homogeneidade da amostra.

3.3.2 - Concentração da suspensão

É um importante fator a ser considerado no preparo das suspensões, sendo recomendável considerar a razão massa/volume para estabelecer exatamente a preparação da suspensão ao invés de suas porcentagens, devido a problemas relacionados a obtenção de suspensões com mesma concentração quando usado esta última (3 mg/1mL e 300 mg/100mL) [37]. Para a obtenção da massa de amostra adequada e o volume de diluente para a preparação da suspensão, deve ser considerado a concentração do analito e a faixa linear de resposta.

Para baixas quantidades de analito na amostra, suspensões concentradas podem ser usadas para obter baixos limites de detecção e quantificação, contanto que o aumento das partículas em suspensão não afete a eficiência do transporte e não produza efeitos de matriz [38]. Altas taxas massa/volume também são adequadas para amostras com características físicas que dificultem a diminuição do

tamanho da partícula por moagem [39]. Para GF AAS suspensões concentradas mostram uma redução na precisão devido a problemas relacionados à pipetagem [40]. A manutenção da estabilidade de suspensões concentradas torna-se difícil para amostras de alta densidade. Efeito de matriz pode ser observado com suspensões mais concentradas devido à presença de concomitantes, gerando maiores sinais de fundo [41]. Quando a amostra possui grande quantidade de analito a diluição torna-se necessária, mas deve ser feita dentro de uma faixa limitada, pois perda de precisão ocorre em suspensões muito diluídas devido a um pequeno número de partículas em suspensão.

3.3.3 - Meio líquido

Também chamados de diluente, influenciam diretamente a precisão e exatidão das medidas atuando como meio e como extrator do analito para o meio. São selecionados de acordo com a natureza da matriz e o analito de interesse. O HNO_3 é o ácido mais utilizado para a maioria das matrizes, o qual atua também como modificador químico, eliminando a matriz e melhorando a sensibilidade e a extração do analito da partícula sólida para o meio, aumentando a precisão [42,43]. Por ser um ácido oxidante pode vir a causar danos às partes oxidáveis dos aparelhos, portanto soluções diluídas devem ser utilizadas. Quando a força ácida do HNO_3 não é suficiente, outros diluentes podem ser utilizados como H_2O_2 , HCl , HF , e uma série de outras substâncias, utilizados juntos (para potencializar uma característica de algum deles) ou individualmente, variando com a matriz e o analito. Também o uso de H_2O é reportado na literatura como diluente, com bons resultados [44]. No GF AAS podem ocorrer problemas relacionados à incompleta mineralização da matriz, deixando resíduos no tubo de grafite, obstruindo o caminho óptico e diminuindo a relação sinal/ruído [45].

3.3.4 - Partição do analito

Representa a porcentagem do analito no meio líquido, afetando diretamente precisão e exatidão. A partição do analito relaciona-se com o meio líquido e sua

conseqüente força de extração. Baixos valores de RSD são diretamente relacionados com uma maior extração do analito para o diluente. Solubilização do analito depende da força da ligação do elemento com a matriz, tamanho da partícula, tipo e concentração do diluente, além da eficiência de homogeneização e tempo de exposição do diluente a homogeneização [46]. Embora a extração melhore a precisão, não é condição essencial para exatidão nas medidas, pois analitos facilmente liberados da matriz caracterizarão altas taxas de extração, no entanto caso haja partículas de diâmetro relativamente grande, não haverá garantias de extração do elemento na parte mais interna da partícula [32,37]. Concomitantes podem eventualmente ser também extraídos para a solução, podendo haver absorção molecular a qual aumentará os valores do sinal de fundo [47]. Às vezes é necessária uma etapa de pré-digestão para melhorar o sinal atômico e diminuir o sinal de fundo porque aumentaria o tempo de contato entre a matriz sólida e o meio líquido, tendendo a eliminação da matriz com o inconveniente do aumento do tempo total de análise [48].

3.3.5 - Sistemas de homogeneização

Sistemas de agitação são comumente empregados no preparo das suspensões, visando uma distribuição homogênea das partículas no meio líquido, podendo gerar erros em termos de precisão e exatidão devido ao analito estar distribuído principalmente em partículas de alta densidade as quais sofrem rápida sedimentação, portanto os sistemas de homogeneização são responsáveis diretos para evitar a rápida sedimentação do material particulado. Cinco modos de agitação tem sido os mais usados no preparo das suspensões, a saber: agitação manual, mecânica, magnética, borbulhamento de gás e ultrasônica. Outros sistemas de homogeneização podem ser utilizados, no entanto são vistos como meios alternativos, e não se situam como sistemas efetivos.

3.3.5.1 - Agitação manual

Simple e consiste em agitar manualmente por poucos segundos o recipiente que contém a suspensão, imediatamente antes de sua introdução no nebulizador

(para FAAS e ICP OES) ou da pipetagem pelo amostrador automático (GF AAS). É também utilizada antes de outros sistemas mais vigorosos visando uma maior eficiência do processo de homogeneização. A agitação manual torna-se ineficiente quando as partículas da suspensão são de alta densidade e com facilidade depositam-se no fundo do recipiente, tornando necessário o uso de agentes estabilizantes [49].

3.3.5.2 - Agitação mecânica

Caracterizam-se por simplicidade operacional e baixo custo, sendo de difícil automação devido a importantes modificações que devem ser realizadas no aparelho. Na grande maioria das vezes é necessária também a agitação manual antes da introdução da amostra no atomizador. São ideais para preparo de grandes volumes de suspensões (acima de 10 mL) [35,37].

3.3.5.3 - Agitação magnética

Apresentam baixo custo e simplicidade operacional, com automação indisponível comercialmente, apenas sistemas adaptados [50]. Problemas podem ocorrer na análise de matrizes ferrosas, possivelmente devido a partículas com grandes quantidades desse elemento ficarem aderidas no bastão.

3.3.5.4 - Borbulhamento de gás

São utilizados no amostrador automático do GF AAS onde são facilmente adaptados sendo simples e econômicos, necessitando apenas do software para controle da interrupção do fluxo. O funcionamento consiste na passagem do gás inerte, normalmente argônio, através do copo do amostrador onde esse fluxo é interrompido imediatamente antes da pipetagem. A limitação desse sistema está relacionada com a produção excessiva de bolhas em solventes orgânicos e a não utilização de agentes estabilizantes para manutenção da homogeneidade.

3.3.5.5 - Homogeneização ultrasônica

Têm aumentado seu uso ultimamente devido à disponibilidade de sistemas relativamente simples e de baixo custo comercial. As ondas ultrasônicas utilizadas nestes dispositivos são de baixa frequência e os efeitos químicos ocorrem devido à chamada cavitação acústica, que consiste em um processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes nos líquidos [51]. Mais ainda faz com que o analito seja parcialmente extraído para o meio líquido principalmente com as suspensões em meio ácido, melhorando a calibração e precisão. São basicamente de dois tipos, o banho ultrasônico e a sonda ultrasônica. O banho é mais largamente utilizado do que a sonda devido ao custo ser menor, em compensação a sonda é mais eficiente, pois é projetada para ser introduzida diretamente no recipiente que contém a suspensão melhorando a dissipação da energia ultrasônica, devendo-se observar seu uso com meio líquido adequado para este não reagir com o material constituinte da sonda. A sonda pode ser adaptada ao amostrador automático do GF AAS e torná-lo mais versátil sistema este que está disponível comercialmente. A sonda é recomendada principalmente, para uso na análise de sedimentos por evitar a deposição do material no fundo do recipiente, garantindo a estabilidade da suspensão durante a pipetagem [52].

3.3.6 - Agentes estabilizantes

Também chamados surfactantes, visam simplificar a preparação da homogeneização da suspensão. Atuam de acordo com características físico-químicas das amostras sólidas e influenciam a precisão das medidas uma vez que evitam a rápida sedimentação das partículas e a formação de aglomerados, dificultando a movimentação das partículas no meio, aumentando a viscosidade do meio. Para partículas de alta densidade os agentes estabilizantes tendem a ser ineficientes. Muitos deles possuem o inconveniente de produzirem espuma, causando problemas de pipetagem em amostradores automáticos [53]. Triton X -100 é um dos surfactantes mais empregados, principalmente para suspensões de matrizes inorgânicas [38,54], embora hexametáfosfato também seja empregado

para evitar erros em matrizes de alta densidade [55]. Para matrizes orgânicas glycerol e viscalex têm bons resultados com menores RSD's [56]. Deve-se estabelecer as concentrações ótimas de agente estabilizante para cada suspensão em função das características de cada matriz, pois altas concentrações podem causar aumento no valor do branco.

3.3.7 - Modificadores químicos

São utilizados em GF AAS onde influenciam diretamente os processos que ocorrem no atomizador, ajudando a reter o analito quando temperaturas mais altas são aplicadas durante a pirólise objetivando a diminuição do efeito de concomitantes ou melhorar a atomização [57]. A eficiência do modificador dependerá do seu mecanismo de ação com o analito ou com a matriz durante a etapa de aquecimento, embora seu modo de ação não seja completamente conhecido. É reportado na literatura que às vezes a própria matriz atua como modificador, alterando o comportamento térmico do analito, principalmente em matrizes orgânicas [41,42]. O uso de modificadores químicos pode ser extremamente vantajoso quando se deseja obter rápidos programas de temperatura, diminuindo o tempo total de análise.

3.4 - APLICAÇÃO DA AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO NA ANÁLISE DE ALIMENTOS

A qualidade dos alimentos consumidos pela população tem sido uma preocupação constante por parte das autoridades e a comunidade científica em geral, onde vários encontros e comunicações científicas têm sido dedicados a este tema. Neste sentido devem-se estabelecer limites para contaminantes inorgânicos e realizar o monitoramento nesses alimentos. Segundo a legislação nacional vigente, Decreto nº 55871 de 26 de março de 1965 e portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998 (Anexos B e C), regulamenta os princípios gerais para o estabelecimento de limites máximos para contaminantes inorgânicos em alimentos, onde considera antimônio, arsênio, cádmio, cobre, chumbo, cromo, estanho, mercúrio, níquel, selênio e zinco como contaminantes [58,59]. Para o manganês não são estabelecidos os limites máximos de tolerância e sim os níveis para ingestão diária

recomendada (IDR) em diferentes faixas etárias e grupos populacionais [60]. Na Tabela 2 são apresentados os valores recomendados.

Tabela 2 - IDR em diferentes grupos populacionais

Grupo	Massa de Manganês (mg)
Adultos	5,0
Lactente (0 - 0,5 ano)	0,3 - 0,6
Crianças	
• 0,5 - 1 ano	0,6 - 1
• 1 - 3 anos	1,0 - 1,5
• 4 - 6 anos	1,5 - 2,0
• 7 - 10 anos	2,0 - 3,0
Gestante	2,0 - 5,0
Lactantes - 1º ano	2,0 - 5,0

Na literatura encontram-se inúmeros trabalhos que descrevem o desenvolvimento de métodos para determinação de diferentes elementos nas mais diversas amostras por variadas técnicas. A Tabela 3 é apresentada uma revisão bibliográfica de trabalhos publicados sobre determinação de elementos por amostragem de suspensão em inúmeras amostras.

Na grande maioria dos trabalhos os autores propuseram a suspensão com ácidos e agentes estabilizantes, predominando HNO_3 e Triton X-100. Modificadores de matriz também foram usados com certa frequência, destacando-se $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, além do uso de paládio como modificador permanente. Agentes antiespumantes também foram utilizados para melhorar a pipetagem da alíquota. PTFE como agente fluorinante foi usado para promover a vaporização e melhorar o transporte do analito. Etapas de pré-digestão que consistem em deixar a matriz em contato com o ácido concentrado por um período de tempo sem, no entanto digeri-la completamente foram pouco usadas. Digestão parcial das amostras, normalmente em forno microondas, foi também pouco usada, visando à eliminação parcial da matriz e a conseqüente diminuição do tamanho da partícula além da liberação do analito para o meio. Métodos pouco usuais como homogeneização por digestão

enzimática antes do preparo da suspensão também são reportados. Há também descrição de método de introdução da amostra por um capilar para gerar o aerossol térmico na chama.

A Tabela 3 descreve as aplicações da amostragem de suspensão na análise de alimentos onde são apresentados as amostras, analitos, técnica analítica e comentários relevantes sobre cada um dos artigos.

Tabela 3 - Aplicações da amostragem de suspensão na análise de alimentos

Matriz	Analito	Técnica Analítica	Comentários	Referência
Folhas e raízes de arroz	Fe	GF AAS	Comparação entre digestão com HNO ₃ e HCl; suspensão com solubilização em TMAH; Suspensão com HNO ₃ e banho ultrasônico e análise direta do sólido	[21]
Folhas de chá	Pb	GF AAS	100 mg de amostra em HNO ₃ + H ₂ O ₂	[25]
Espinafre	Pb	GF AAS	Viscalex HV 30 e introdução no forno	[26]
Páprica	Pb	GF AAS	Calcinação em 350°C e preparo da suspensão com 0,1% v/v de Triton X-100 + 0,1% NH ₄ H ₂ PO ₄	[33]
Mariscos	As	GF AAS	Comparação entre suspensão em banho ultrasônico; extração assistida por ultrasom e digestão por radiação microondas	[34]
Biscoito e pão	Cu	GF AAS	0,5% v/v HNO ₃ + 20% v/v etanol e metodologia de aquecimento rápido	[39]
Frutas	Cd, Cu, Fe, Pb e Se	GF AAS	Adição de Triton X-100 e 10 g de esferas de zircônio até formação da suspensão	[41]

Fígado, farinha de arroz e farinha de trigo	Cd	GF AAS	Pré-concentração por bactérias <i>Escherichia</i> (pH 5) e <i>Pseudomonas</i> (pH 9) em HNO ₃ 3,5 mol.L ⁻¹ e introdução no forno	[42]
Café e chá	Al	GF AAS	0.2% v/v HNO ₃ + 10% v/v Triton X-100 e medida do sobrenadante	[45]
Mariscos	Se	GF AAS	Amostra previamente liofilizada. Programa de aquecimento rápido sem etapa de secagem	[47]
Leite, fígado e folhas de oliva	Cd	GF AAS	Pd e NH ₄ H ₂ PO ₄ como modificadores e etapa de pré-atomização	[50]
Peixe	Pb	GF AAS	Tiouréia foi usado como modificador químico	[61]
Folhas de chá	V, Cu, Cr, Fe e Zn	ETV-ICP OES	Emulsão de PTFE como agente fluorinante	[62]
Chocolate	Cu	FAAS	HCl 2,0 mol.L ⁻¹ + banho ultrasônico por 15 min	[6]
Farinha de arroz	Mn	FAAS	HNO ₃ 2,0 mol.L ⁻¹ + banho ultrasônico por 15 min	[63]
Folhas de chá	V, Cu, Cr, Fe, Zn e La	ETV-ICP OES	Emulsão de PTFE como agente fluorinante	[64]

Vegetais	Pb	GF AAS	Forno de molibdênio e tioureia como modificador	[65]
Alimento infantil	Se	GF AAS	0,1% Triton X-100 + 5% v/v HNO ₃ conc. e comparação com HG AAS	[66]
Lagosta e leite em pó	Na, K, Ca, Mg, P, Cd, Cu, Mn, Sr e Zn	MIP-OES	Suspensões após a câmara de spray são introduzidas diretamente na cavidade da tocha do microondas	[67]
Leite	Hg	CV-AFS	Banho ultrasônico (10 min) de água régia 8% v/v + Antifoam A 2% v/v + Cloreto de hidroxilamina 1% m/v. A seguir substitui cloreto por 8mmol de KBr e 1,6 mmol de KBrO ₃ em HCl	[68]
Vegetais	Cd	GF AAS	Tubo de molibdênio, glicerol 10% como estabilizante da suspensão e tiouréia como modificador	[69]
Farinha de arroz e farinha de trigo	Cu, Zn e Mn	GF AAS	Emulsão de PTFE como agente fluorinante	[70]
Frutas e Mariscos	Cd e Pb	GF AAS	Moagem criogênica foi usada, carbeto de tungstênio e ródio como modificador permanente e NH ₄ H ₂ PO ₄ como modificador	[71]

Mariscos	Se	GF AAS	3% v/v HNO ₃ + 0,01% m/v Triton X-100 misturados em um amostrador ultrasônico automático em 20% de amplitude 30 s antes da introdução da alíquota no forno	[72]
Corantes	Hg	GF AAS	Meio contendo 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO ₃ + 2% m/v KMnO ₄ + 3% m/v Ag(NO ₃) ₂ . Comparação com digestão em microondas	[73]
Corantes	As, Cd e Pb	GF AAS	Modificador 0,3% m/v Ni para As 1% m/v NH ₄ H ₂ PO ₄ para Cd e Pb.	[74]
Alimento infantil	Al e Cr	GF AAS	0,5% v/v HNO ₃ conc. + 5% v/v H ₂ O ₂ conc. + 0,1% m/v Triton X-100 (Cr) ou 10% v/v etanol (Al)	[75]
Alimento infantil e Mariscos	Hg	GF AAS	Programa de aquecimento rápido para evitar perdas por volatilização.	[76]
Alimento infantil	Cu, Co, Ni e Mn	GF AAS	0,1% m/v Triton X-100 + + 30% v/v H ₂ O ₂ conc. + 0,5% v/v HNO ₃ conc. + 1% m/v NH ₄ H ₂ PO ₄ (Cu)	[77]

Mariscos	Cd	GF AAS	Temperatura de pirólise de 600°C obtida com 50 mg.L ⁻¹ NH ₄ H ₂ PO ₄	[78]
Alimento infantil	Se, Pb e Cd	GF AAS	0,1% m/v Triton X-100 + 30% v/v H ₂ O ₂ conc. 1% v/v HNO ₃ e 0,5% m/v Ni (Se), 0,2% m/v Ni + 1% m/v NH ₄ H ₂ PO ₄ (cd) e 1 NH ₄ H ₂ PO ₄ m/v NH ₄ H ₂ PO ₄ (Pb)	[79]
Alimento infantil	As	GF AAS	0,1% m/v Triton X-100 + 20% v/v H ₂ O ₂ conc. + 1% v/v HNO ₃ conc. + 0,3% m/v Ag(NO ₃) ₂	[80]
Farinha de trigo	Ni, Cr e Co	GF AAS	15% v/v HNO ₃ + 10% v/v H ₂ O ₂ + agitação mecânica entre as medidas	[81]
Folhas de chá	Ba, Cu, Fe, Pb e Zn	GF AAS	4% v/v HNO ₃ 0,005% m/v Triton X-100, sonda ultrasônica com 55% de potência para homogeneizar	[82]
Peixe	As, Se e Hg	ETV-ICP-MS	Paládio e tioacetamida foram usados como modificadores permanentes	[83]
Fígado	Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Se	GF AAS	Amostra foi misturada com 20 mL (etanol + água) + 0,25% v/v TMAH e a mistura resultante submetida a homogeneização em 38,9 MPa	[84]

Farinha de arroz	Cd	GF AAS	Goma de Xanthan foi utilizada para solubilizar a amostra	[85]
Vegetais	Co e Ni	GF AAS	0,025% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO ₃ + 10% v/v H ₂ O ₂ foi usada para prevenir acúmulo de resíduos carbonáceos no atomizador	[86]
Lagosta	Cd, Cu, Fe e Zn	MIP-OES	Após a câmara de spray há a introdução direta na cavidade do plasma sem dessolvatação	[87]
Amostras certificadas de arroz, trigo e fígado	Mo	FETV-ICP OES	Emulsão de PTFE como agente fluorinante	[88]
Vegetais	Tl, Mn e Pb	ETA-LEAFS	Iluminação frontal da superfície não permitiu a modificação do atomizador	[89]
Vegetais	Pb	HG AAS	Amostras foram suspensas em Triton X-100 e misturadas com 10 g de esferas de zircônio	[90]
Cacau, leite e ostras	Ca	FAAS	Aspiração da suspensão e introdução diretamente na chama	[91]
Vegetais	Cd	GF AAS	Secagem prévia para evitar acúmulo de resíduos carbonáceos	[92]

Espinafre	Pb	GF AAS	2% v/v Viscalex HV 30 em pH 6-10 + água. Redução dos efeitos de matriz passando fluxo pequeno de Ar durante etapa de secagem	[93]
Vegetais	Ca, Mg, K, Fe, Mn, Zn e Cu	FAAS	Amostragem líquida de suspensão carbonácea	[94]
Farinha de arroz	Cd e Pb	BIFF-AAS	Homogeneização criogênica + 5 mL HNO ₃ 2,8 mol.L ⁻¹ , banho ultrasônico, centrifuga 5 min, medir sobrenadante	[95]
Leite	As, Sb, Se, Te e Bi	HG-AFS	Água régia (10 min) em banho ultrasônico e pré-redução com KBr (Se e Te), KI + ácido ascórbico (As e Sb), Bi determina sem pré-redução	[96]
Café e leite	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sn e Zn	ICP OES	Adição de TMAH e solubilização em 80°C	[97]
Vegetais	Se	TF AAS	Se extraído em benzeno com HCl e adição de KI e óxido de cobalto III, depois o óxido foi separado do benzeno por filtração a vácuo	[98]

Vegetais	Cr, Co e Ni	GF AAS	1% v/v HNO ₃ + 10% v/v H ₂ O ₂ e otimização do programa de temperatura	[99]
Laticínios	Pb e Cd	GF AAS	Adição de Triton X-100 e 10 g de esferas de zircônio até formação da suspensão	[100]
Farinha de trigo, batata e leite	Pb	GF AAS	0,1% de Pd foi usado como modificador de matriz. Photron Pb superlamp com alta intensidade	[101]
Folhas de chá	Al, Ba, Ca, Mg, Mn e Zn	ICP OES	Método de adição padrão generalizado (GSAM), baseada no princípio da variação de ambas as massas das amostras e quantidade de solução padrão adicionada	[102]
Folhas de chá	Al	FETV-ICP OES	Microcoluna com resina trocadora de cátions foi usada para ótima separação das espécies de alumínio	[103]
Leite queijo e chocolate	Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni e Pb	GF AAS	Mistura de HNO ₃ + H ₂ O ₂ usada no preparo da suspensão e resultados comparados com digestão completa usando HNO ₃ + H ₂ O ₂ + HClO ₄	[5]

Fígado e couve	Cd, Cu e Pb	GF AAS	Viscalex HV 30 para estabilizar a suspensão. Introdução de oxigênio na etapa de secagem	[104]
Vegetais	Ca, Mg, Fe, Zn e Mn	FIA FAAS	Calcinação da amostra e preparação da suspensão	[105]
laticínios	Al	GF AAS	Mineralização com HNO ₃ + V ₂ O ₅	[106]
Cacau e café	Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn	ICP OES	Microcâmara com agitador magnético confeccionado no laboratório	[107]
Lapa	Cu e Zn	FAAS	Amostra triturada e peneirada, adição de HNO ₃ 1 mol.L ⁻¹ e sonicação por 15 min	[108]
Krill	Cu, Fe, Mn e Zn	FAAS	HNO ₃ 2 mol.L ⁻¹ (Cu, Fe e Zn) e HNO ₃ 4 mol.L ⁻¹ (Mn)	[109]
Peixe	Se	GF AAS	Oxalato de amônio como modificador	[110]
Derivados de leite	Al	FIA GF AAS	Preparação da suspensão no auto-amostrador e homogeneização em uma câmara de mistura	[111]
Amostras certificadas de atum, peixe, fígado e mexilhão	Cd, Co e Pb	GF AAS	Amostras sonicadas 20 s antes da introdução no forno com modificador permanente de W-Rh	[112]

Mariscos	Hg	FIA CVAAS	Preparação da suspensão, banho ultrassônico, introdução da amostra em fluxo no vapor frio e medida	[113]
Peixe	Cd	GF AAS	Propõe W-Rh tão eficiente quanto o convencional Pd+Mg(NO ₃) ₂	[114]
Marisco e repolho	Cd, Cu, Mn e Pb	GF AAS	5% HNO ₃ e agitador magnético	[115]
Peixe	Pb	GF AAS	NH ₄ H ₂ PO ₄ como modificador, adaptação do autoamostrador para permitir agitação magnética	[116]
Vegetais e peixe	Pb	HG AAS	Comparação entre três meios ácidos: HNO ₃ + H ₂ O ₂ ; NH ₄ SO ₄ + HNO ₃ e KCr ₂ O ₇ + C ₂ H ₄ OHCO ₂ H (ácido láctico)	[117]
Mariscos	Al	FETV-ICP OES	Emulsão de PTFE como agente fluorinante	[118]
Lagosta	Cu e Zn Cu, Zn e Cd	FAAS ICP OES	Avaliação de agitação magnética e ultrassônica. 0,5% v/v HMTP	[119]
Alcachofra	Cu e Mn	FAAS	Sistema em linha para pré-digestão assistida por microondas	[120]
Suco de Frutas	Se	FIA GF AAS	Diluição da suspensão e medida do sobrenadante	[121]

Vegetais	Cu	GF AAS	Comparação entre métodos: digestão por via úmida e seca, microondas e suspensão	[122]
Peixe	Pb	GF AAS	A suspensão foi decomposta por um curto período em microondas e a solução resultante coletada no autoamostrador do aparelho	[123]
Fígado	Se	GF AAS	Homogeneização por digestão enzimática antes da preparação da suspensão	[124]
Suco de frutas e leite	Cu e Zn	TS-FF-AAS	Diluição de amins terciárias (CFA) 20% v/v em pH 8 + amostra, formação do aerossol térmico	[125]
Suco de frutas	Al	GF AAS	Sistema em fluxo gera informações acerca da distribuição do analito pela diferença entre o conteúdo do Al suspensão e no filtrado	[126]

Alguns trabalhos de revisão sobre amostragem de suspensão são encontrados na literatura enfatizando características diversas. Butcher [127] descreveu a volatilidade dos elementos para ET AAS, bem como a atomização de suspensões de corantes alimentícios, além de algumas aplicações tanto na técnica mencionada, quanto em ETA LEAFS. de BENZO et. al. [128] discutiram as aplicações da técnica de amostragem de suspensão para materiais biológicos. Miller-ihli [35] discutiu a efetividade da agitação ultrasônica além de estratégias para otimização, densidade de partículas, tamanho e partição do analito para amostras biológicas em suspensões. Matusiewicz [23] descreveu métodos analíticos e técnicas para geração de hidretos como modo de introdução da amostra por suspensão no atomizador. Bendicho e Loos-vollebregt [31] discutem os problemas e soluções para a introdução de amostras sólidas nos atomizadores. Darke e Tyson [129] descreveram os problemas encontrados com a introdução de amostras sólidas em ETV-ICP OES e ETV-ICP-MS e compararam com os resultados obtidos por LA-ICP OES, nebulização da suspensão em ICP OES e introdução da suspensão via ETV-ICP OES na determinação de bário e chumbo em amostras geológicas. Ebdon et. al. [130] discutiram os fatores que influenciam o preparo das suspensões e a introdução das mesmas no sistema de nebulização de ICP OES, não incluindo publicações relacionadas com AA. Cal-Prieto et. al. [22] discutiram a introdução direta de amostras no GF AAS sob a forma de suspensão e fizeram uma retrospectiva do progresso da técnica de 1990 - 2000. Magalhães e Arruda [131] revisaram características da amostragem de suspensões na análise de traços, suas vantagens, limitações e aplicações.

CAPÍTULO 4

EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR COBRE, MANGANÊS E ZINCO

4.1 - COBRE

O cobre ocupa o 26º lugar em abundância na crosta terrestre foi descoberto cerca de 9.500 a.C. no atual Iraque. Amplamente distribuído na natureza, ocorre em muitos minérios na forma de óxidos ou sulfetos, sendo a malaquita, calcopirita e calcocita as principais fontes [132].

A concentração de cobre em alimentos varia de país para país de acordo com o tipo de produto, condições de cultivo (solo, água, uso de fertilizantes e fungicidas) [133].

4.1.1 - Essencialidade e Toxicidade

O cobre apresenta em geral disponibilidade limitada no meio ambiente, sendo que a principal fonte de ingestão de cobre pelos seres humanos são os alimentos [134]. Sua essencialidade deve-se a sua incorporação a um grande número de enzimas e proteínas estruturais. Participa como co-fator em algumas atividades enzimáticas; possui estrutura apropriada para ação catalítica em algumas reações enzimáticas; é essencial para a utilização de ferro na formação de hemoglobina [135].

Deficiência do metal no organismo causa disfunção cardíaca; elevação da fração de colesterol de alta densidade e diminuição da depuração de glicose. A toxicidade aguda não é freqüente e normalmente está relacionada a ingestão acidental ou intencional ou ainda a contaminação de bebidas, assim níveis excessivos causam a curto e longo prazo disfunções hepáticas; convulsões; disfunção cognitiva; catarata, defeitos renais; arritmia cardíaca; osteoporose; ginecomastia; e hiperpigmentação [132]

4.2 - MANGANÊS

O manganês está entre os elementos mais abundantes da crosta terrestre. É um elemento essencial e o corpo humano contém, geralmente, pequenas quantidades do metal, onde apenas de 3 a 5% deste elemento contido nos alimentos é absorvido. Servem como fonte primária do metal [136].

4.2.1 - Essencialidade e Toxicidade

O manganês é essencial como co-fator para enzimas e está presente em metaloproteínas; também atua na transmissão dos impulsos nervosos [137]. A disponibilidade do manganês proveniente de vegetais é significativamente diminuída pela presença de alguns componentes, como fibras. Indivíduos com deficiência em ferro têm a velocidade de absorção do manganês aumentada [132].

Certos grupos da população em geral estão mais expostos ao manganês: crianças, populações residentes próximas a indústrias e em áreas de ocorrência natural do metal, no solo e na água [138].

A deficiência de manganês produz anormalidades esqueléticas e reprodutivas. A toxicidade do manganês causa deficiência principalmente nos pulmões e cérebro. Pesquisas têm relacionado o Mal de Parkinson à intoxicação por manganês por longo tempo, devido a alterações histológicas no sistema nervoso [139]. O Mn altera ainda o mecanismo de transmissão sináptica, chegando em alguns casos a bloqueio na distribuição de outros elementos como Zn, Cu, Na, K e Mg no cérebro além de inibições neuromusculares.

4.3- ZINCO

O zinco se distribui pelo ar, água e solo como resultado de processos naturais e atividades humanas. Grande parte do zinco entra no ambiente como resultado de atividades antrópicas como mineração e queima de carvão [140].

A concentração de zinco em plantas depende da espécie, pH do solo e composição do solo. As espécies vegetais não concentram zinco acima dos níveis presentes no solo [141].

4.3.1 - Essencialidade e Toxicidade

Para o homem, o zinco funciona como um elemento essencial e necessário ao metabolismo, acumulando-se no fígado, pâncreas e próstata, participando como co-fator na ação de mais de 200 metaloenzimas e tanto a deficiência quanto o excesso pode gerar efeitos diversos [142].

Deficiência de zinco pode causar falha no crescimento, cegueira noturna, atrofia testicular, impotência, retardo na cicatrização de ferimentos, doença renal crônica e anemia, infarto no miocárdio, artrite e hipertensão.

O excesso do metal no organismo provoca sudorese e fraqueza, distúrbios estomacais, danos pancreáticos, deficiência de cobre, deficiência respiratória, letargia e deficiência motora [143].

Amostras de cabelo e unha oferecem um resultado que representa a exposição ao metal em longo prazo, por semanas ou meses. Medidas da concentração de zinco no cabelo podem ser alteradas pela contaminação externa, suor e localização da amostra coletada (distante da raiz) [132].

CAPÍTULO 5

ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA MULTI-ELEMENTAR

5.1 - EVOLUÇÃO DA TÉCNICA

Desde as primeiras observações qualitativas da luz, dispersa nos seus componentes em um prisma por Isaac Newton, passando pelo trabalho de Alan Walsh em 1955, considerado o pai da moderna espectroscopia, onde detalha os princípios básicos envolvidos, necessidades instrumentais e vantagens em relação à emissão de chama até os dias atuais, a absorção atômica (AA) desenvolveu-se bastante e ainda avança, frente a outras técnicas analíticas modernas [144.-146].

Apesar de AA ser bem estabelecida como técnica para a determinação de metais a nível de traços, a determinação multielementar ainda é o grande desafio na técnica, tendo em vista que fatores como baixos limites de detecção, facilidade operacional e baixo custo instrumental devem sempre ser considerados. Alguns problemas foram contornados como a introdução de amostras sólidas ou em suspensões, permitindo a análise direta de amostras reduzindo o tempo total dispendido. Algumas propostas têm sido colocadas em prática como a AA seqüencial e a simultânea onde alguns trabalhos têm sido publicados enfatizando este tema [147-148].

Nas determinações seqüenciais, um monocromador de rede com detector tipo fotomultiplicadora, com movimentação de rede por meio de um motor de passo controlado digitalmente, faz com que os diferentes comprimentos de onda possam ser focalizados precisa e seqüencialmente na fenda de saída, onde estará localizado o detector. Nas determinações simultâneas existem sistemas de medida direta do espectro que é focalizado sobre uma rede de difração côncava produzindo, separadamente, o espectro de linhas para cada analito, direcionando-o em torno do ciclo de Rowland onde fendas de saída isolam cada linha espectral e tubos fotomultiplicadores detectam o sinal de cada linha isolada [149].

5.2 - ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA SEQÜENCIAL

Baseia-se em um programa que permite alterar as condições de operação do equipamento entre as medidas, são elas: seleção e corrente da lâmpada, abertura da fenda do monocromador, posição da rede de difração, vazão dos gases e altura da fenda do monocromador, aumentando a frequência analítica chegando em alguns casos a igualar ou até mesmo superar a frequência analítica de um ICP OES seqüencial. A Figura 5 mostra a configuração óptica de um espectrômetro de absorção atômica em chama seqüencial.

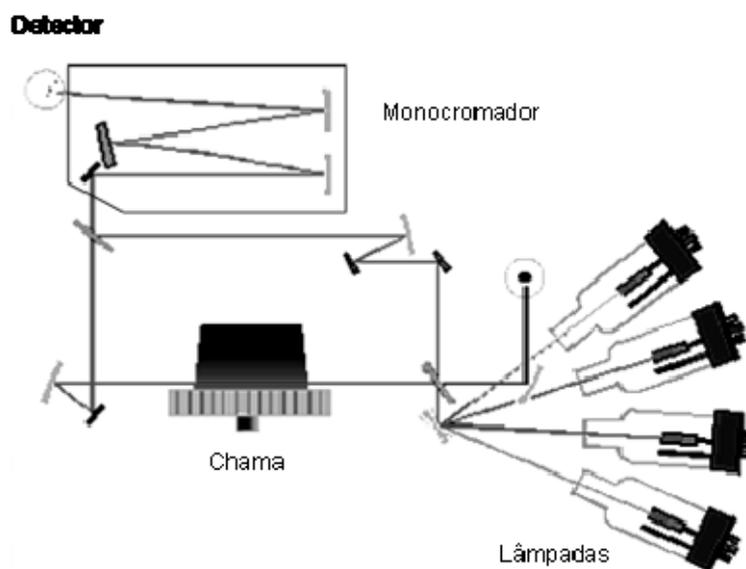


Figura 5- Desenho esquemático de um espectrômetro de absorção atômica seqüencial com atomização em chama.

Convencionalmente, em sistemas monoelementares, é realizada a medida da curva analítica seguido da amostra para este analito para posteriormente ser feita a construção de nova curva para outro elemento seguida da medida da amostra e assim sucessivamente.

No sistema seqüencial, a determinação é simples e permite a medida de todas as curvas dos elementos para então ser efetuada a medida das amostras sem que a solução seja retirada do sistema de aspiração, enquanto o programa em uma janela temporal pequena, cerca de 2s, altera as condições de cada elemento já pré-

estabelecidas pelo analista até completar a seqüência. As medidas ocorrem em ordem decrescente dos comprimentos de onda dos elementos a serem medidos [150].

Os problemas surgem quando os elementos possuem propriedades físico-químicas distintas, requerendo variações nas condições de operação. Projahn et. al. [151] estabeleceram os seguintes requisitos instrumentais para operação do modo seqüencial:

- Vazão dos gases controlada eletronicamente
O programa deve permitir o rápido ajuste de vazão controlado por válvula solenóide operando a 33 Hz e ajuste de vazão constante.
- Monocromador de alta velocidade
Para garantir a rápida troca do comprimento de onda, o monocromador deve ter capacidade de efetuar varredura a $2000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$.
- Lâmpadas alocadas em posições fixas e operadas simultaneamente
Seleção automática das lâmpadas com feixes direcionados ao sistema óptico.

CAPÍTULO 6

PARTE EXPERIMENTAL

6.1 - INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em dois espectrômetros de absorção atômica:

- Espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica SpectrAA 220Z Varian (Mulgrave, Victória, Austrália). Possui correção de fundo por efeito Zeeman, equipado com amostrador automático, configuração de aquecimento longitudinal, campo magnético alternante, orientado perpendicularmente ao feixe de radiação e polarizador fixo. O tubo de grafite utilizado possui plataforma de aquecimento de L'vov. Argônio de alta pureza foi utilizado como gás de purga. A lâmpada de cátodo oco de cobre UltrAA lamp Varian (Mulgrave, Victória, Austrália) foi utilizada em 324,8nm, com corrente de 5 mA e 0,5 nm de largura da fenda espectral.

- Espectrômetro de absorção atômica em chama SpectrAA 220FS Varian (Mulgrave, Victória, Austrália). Possui lâmpada de Deutério para correção de sinal de fundo. Equipado com queimador de pré-mistura, nebulizador concêntrico e sistema de nebulização pneumática como mostrado na Figura 6. A Lâmpada de cátodo oco utilizada foi multielementar UltrAA lamp Varian (Mulgrave, Victória, Austrália) contendo os elementos Cu, Mn, Fe e Zn foi utilizada em 279.5 nm, 248,3 nm e 213.9 nm, e resolução espectral de 0,2 nm, 0,2 nm e 1,0 nm respectivamente para Mn, Fe e Zn. As condições operacionais do espectrômetro estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros operacionais do FAAS.

Parâmetros	Condições
Corrente da lâmpada	10 mA
Altura do queimador	13,5 mm
Vazão de acetileno	2,0 L.min ⁻¹
Vazão de ar	13,5 L.min ⁻¹
Taxa de aspiração	5,5 mL.min ⁻¹

**Figura 6-** Figura de um queimador de pré-mistura.

- O diâmetro médio das partículas da suspensão foi medido usando um microscópio eletrônico de varredura Superscan SS-550 Shimadzu (Kyoto, Japão).
- Banho ultrasônico VWR Modelo 75 D (Cortland, New York, USA) para preparo das suspensões.

- A digestão das amostras foi feita em placa de aquecimento QUIMIS Q 313/22 (Diadema, São Paulo, Brasil) e em bombas de digestão modelo 4746 Parr Instrument Company (USA).
- Forno tipo mufla FABBE, modelo 119 (São Paulo, Brasil)
- Centrífuga JANETZKI T 32 C (Berlim, Alemanha)
- Vidrarias diversas

6.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES

- Toda vidraria utilizada foi mantida em solução de HNO_3 10% v/v durante a noite para descontaminação. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água ultrapura utilizada no preparo de todas as soluções foi obtida de um sistema EASYpure RF (Barnstedt, Dubuque, IA, USA).
- A solução estoque de cobre $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada a partir de uma solução de referência de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Merck por diluição com ácido clorídrico a 1% (v/v).
- A solução estoque multielementar de manganês $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e zinco $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada a partir de soluções de referência de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Merck de cada elemento por diluição com ácido clorídrico a 1% (v/v).
- Ácido nítrico e ácido clorídrico foram preparados por diluição direta com água ultrapura de uma solução concentrada Merck.
- Solução diluente contendo 0,05% v/v de Triton X-100, 10% v/v de etanol e 5% de v/v HNO_3 em água ultrapura.

6.3 - AMOSTRAS

As amostras adquiridas para análise são de chocolate em pó “sem açúcar”, em embalagens de 500 g. Quatro amostras foram coletadas em Ilhéus-Bahia, de safras diferentes, uma em Salvador-Bahia, esta comercializada em todo território nacional e uma recentemente adquirida da Alemanha por colaboradores.

As amostras de chocolate adquiridas foram colocadas em estufa a 80°C por 2 h para retirar umidade. A seguir retiradas, deixadas esfriar em dessecador, acondicionadas em frascos de PTFE secos e limpos e mantidos no dessecador.

Os materiais de referência certificado CRM 10-b (National Institute for Environmental Studies, NIES, Onogawa, Tsukuba, Japão) e SRM 1568a (National Institute of Standards & Technology, NIST, Gaithersburg, MD, USA), foram utilizados para checagem da exatidão do método. A farinha de arroz comercial Arrozina® (Unilever Bestfoods, Garanhuns, Brasil) foi usada para determinação das características analíticas do método.

6.4 - PREPARO DAS AMOSTRAS

É uma etapa crítica dentro do protocolo analítico e geralmente requer cerca de 60% do tempo total de análise e contribui com aproximadamente 30% do erro total [152].

As suspensões para análise foram preparadas adicionando-se uma massa adequada de chocolate em ácido clorídrico (para determinação de cobre) e em ácido nítrico (para determinação de manganês e zinco). A seguir eram submetidas a banho ultrassônico por 15 min e levadas ao equipamento para efetuar as medidas.

A amostragem foi realizada tomando-se três alíquotas da mesma marca e preparadas suspensões distintas. A média aritmética da concentração encontrada em cada uma das três alíquotas foi considerada concentração final.

6.5 - DIGESTÃO POR VIA ÚMIDA

Baseia-se na conversão da amostra em uma forma adequada, utilizando agentes oxidantes e ácidos minerais concentrados (com propriedades oxidantes) e diferentes fontes de energia. São comumente empregados para tal fim ácido nítrico, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, bem como misturas desses reagentes e fontes de energia como térmica, ultrasônica e radiante (infravermelho, ultravioleta e microondas), para auxiliar no processo de dissolução da amostra, permitindo a determinação do analito na solução aquosa resultante [153,154]. Pelo fato do analito permanecer em meio ácido a decomposição por via úmida é útil na determinação de baixas concentrações do metal de interesse. Dois procedimentos foram utilizados para mineralização completa das amostras:

6.5.1 - Digestão ácida em sistema aberto

Em erlenmeyers de 125 mL, pesou-se uma massa de 250 mg de chocolate e adicionou-se 10 mL de ácido nítrico concentrado e 5 mL de peróxido de hidrogênio, colocadas em chapa previamente aquecida a 200°C e deixadas por 30 min. A seguir, foram retiradas e deixadas resfriar em temperatura ambiente, transferidas para um balão e diluídas para um volume final de 25 mL com HNO₃ 0,5% v/v.

6.5.2 - Digestão ácida em sistema fechado

Em bombas de digestão 250 mg de chocolate foi pesada e adicionado 3 mL de ácido nítrico concentrado e 2 mL de peróxido de hidrogênio, foi colocado em mufla a 160°C por 12 h. A seguir as bombas foram deixadas esfriar em temperatura ambiente e a seguir abertas em capelas. O digerido foi transferido para balão e diluídas para um volume final de 25 mL com HNO₃ 0,5% v/v.

6.6 - DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS

Cerca de 10 mg da amostra foi utilizada para medir o diâmetro das partículas no microscópio eletrônico de varredura (MEV), como mostrado na Figura 7. Esta

medida é realizada em amostras tipicamente metálicas. Matrizes orgânicas são “metalizadas”, aplicando uma película fina de metal inerte, normalmente ouro, sobre a sua superfície para então ser efetuada a varredura na amostra. O princípio de funcionamento do microscópio consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo) mediante aplicação de uma diferença de potencial, cuja diferença permite uma variação na aceleração dos elétrons. O filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai os elétrons, resultando em uma aceleração em direção a este. Lentes condensadoras corrigem o percurso do feixe, alinhando-o em direção à abertura da objetiva, a qual ajusta o foco dos feixes antes dos elétrons atingirem a amostra. Desta forma, as imagens são transcodificadas pelo equipamento, possuindo caráter virtual. As ampliações podem chegar até 300.000 vezes.

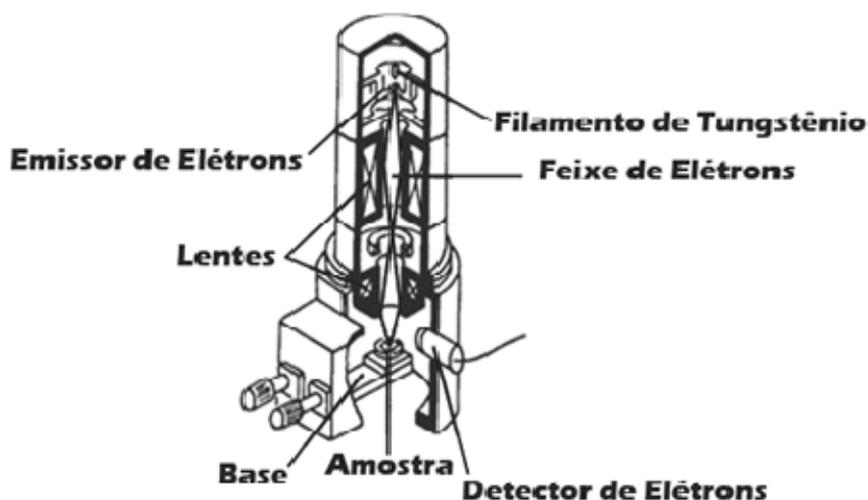


Figura 7- Desenho esquemático de um microscópio eletrônico de varredura.

6.7 - DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

A umidade das amostras foi determinada como descrito em [146]. Baseia-se em secagem, pesagem a 110°C e secagem até que a amostra adquira massa

constante, expressando em forma de porcentagem a diferença entre massa inicial e final.

6.8 - CURVAS ANALÍTICAS

Curvas de calibração foram preparadas utilizando padrões aquosos e adição de analito no chocolate e na farinha de arroz comercial.

Para a curva convencional as soluções para determinação foram preparadas a partir da adição de alíquotas de soluções padrão em ácido clorídrico (para cobre) e em ácido nítrico (para manganês e zinco), para volume final de 10 mL, resultando em soluções de concentrações finais na faixa de 0,35 - 1,15 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para cobre e 0,3 - 1,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para manganês e zinco.

A curva de adição de analito no chocolate foi preparada adicionando-se alíquotas das soluções padrão em ácido clorídrico (para cobre) e em ácido nítrico (para manganês e zinco), para volume final de 25 mL, resultando em soluções de concentrações finais na faixa de 0,2 - 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cobre e 0,3 - 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para manganês e zinco.

No GF AAS as curvas foram preparadas utilizando-se o diluente (descrito no item 6.2) adicionado a 8 mg da amostra em vials do autoamostrador, obtendo volume final de 1,5 mL, considerando experimentos prévios.

6.9 - OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA

A otimização dos parâmetros experimentais que influenciam o preparo das suspensões foi realizada utilizando metodologia univariada. A extensa revisão

bibliográfica (Tabela 3) bem como experimentos prévios, nortearam na escolha das seguintes variáveis:

- Estudo do tipo e concentração do ácido
- Estudo da massa da amostra
- Estudo do tempo de sonicação

CAPÍTULO 7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1- DETERMINAÇÃO DE COBRE UTILIZANDO AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA

7.1.1 - Determinação do diâmetro das partículas

As micrografias obtidas no microscópio eletrônico permitiram estimar a faixa na qual se encontram as partículas da amostra (Figuras 8, 9 e 10). Diâmetros entre 10 e 20 μm melhoram a precisão dos resultados além de incrementarem a extração do analito durante o preparo das suspensões em meio ácido [37].

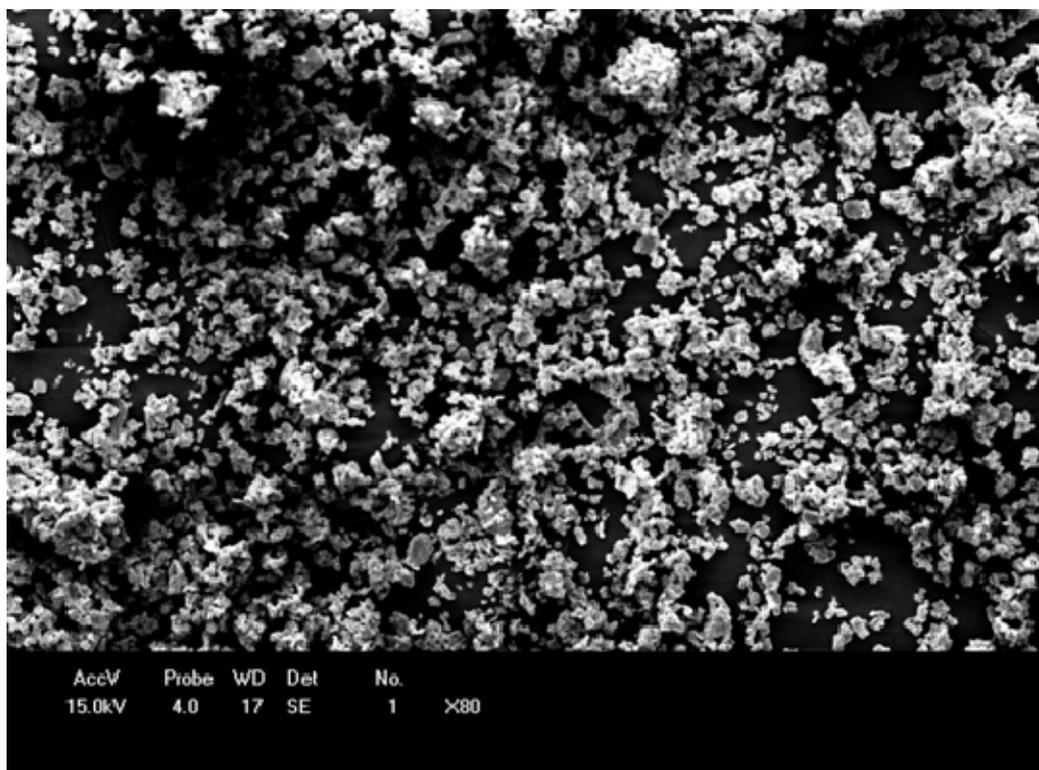


Figura 8- Visão geral do aglomerado.

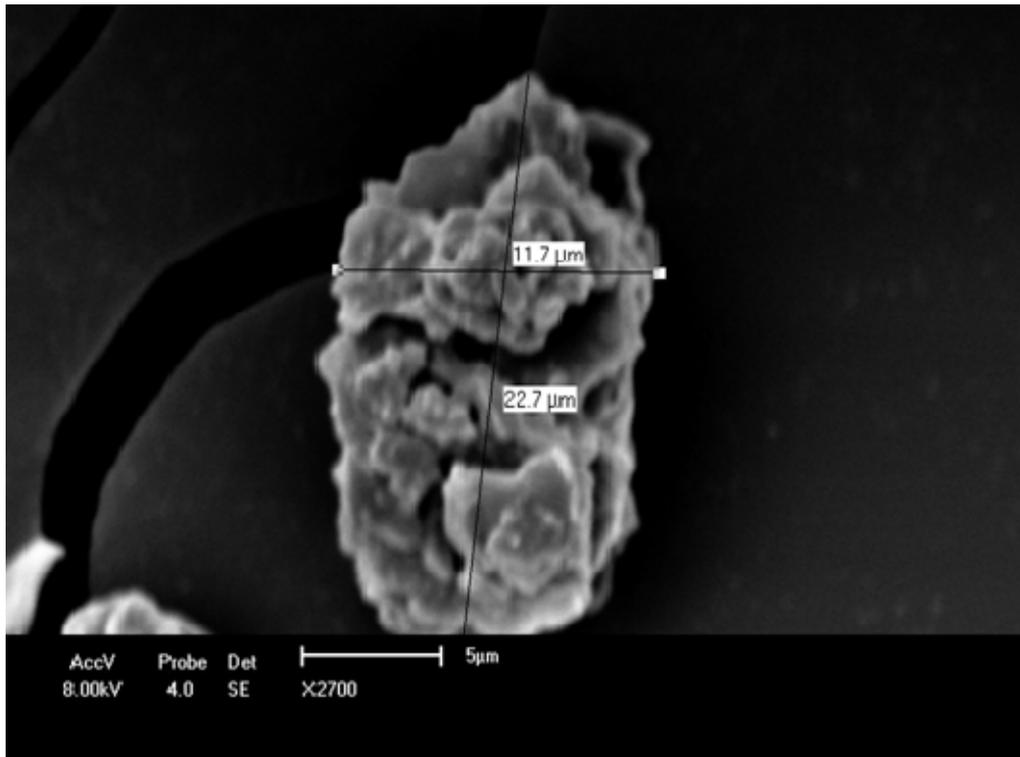


Figura 9- Maior diâmetro de partícula encontrado nas amostras.

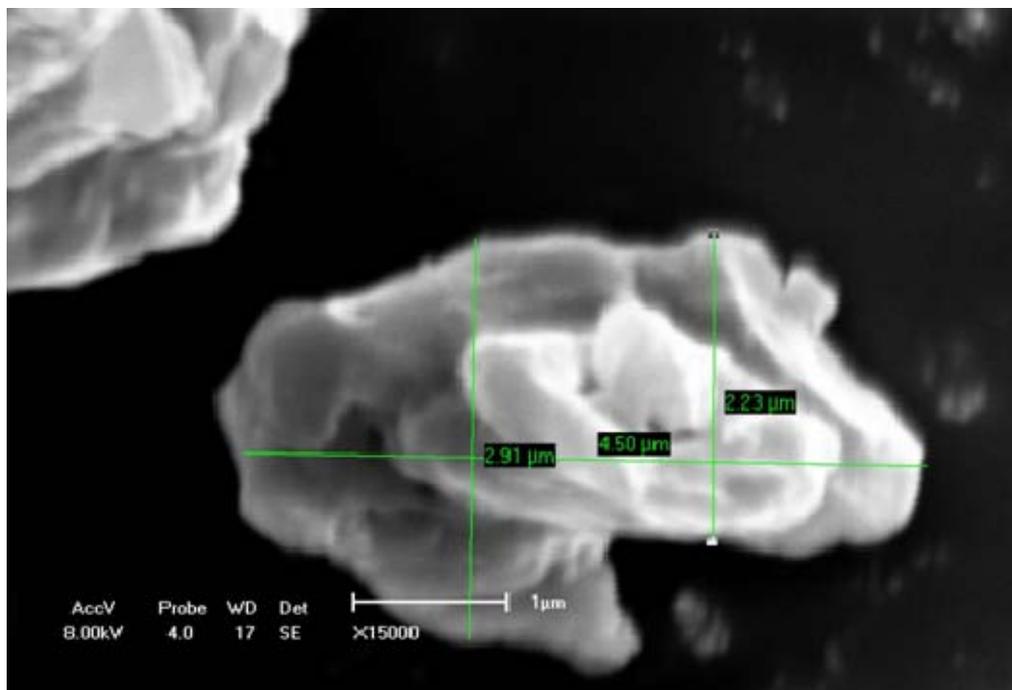


Figura 10- Menor diâmetro de partícula encontrado nas amostras.

Todas as amostras estudadas apresentam diâmetros de partículas adequados para as medidas, as quais variam entre 4 e 23 μm , com diâmetro médio de 15 μm . Não houve portanto, necessidade de operações de moagem ou peneiramento adicionais antes do preparo da suspensão para posterior introdução no sistema de nebulização do equipamento. Tamanhos de partículas maiores poderiam vir a ser utilizados, mas adaptações seriam necessárias [37].

7.1.2 - Variáveis estudadas

A otimização das variáveis foi realizada de forma univariada. Esta metodologia caracteriza-se por fixar todas as variáveis exceto uma, que será estudada variando-a em um intervalo pré-estabelecido. O intervalo e as variáveis estudadas são apresentados na Tabela 5. A natureza de ácido também foi estudada.

Tabela 5- Variáveis e intervalos estudados

Variável	Intervalo	
Concentração do ácido (mol.L^{-1})	1,0	4,0
Tempo de sonicação (min)	0	20
Massa da amostra (mg)	50	400

7.1.2.1- Tipo e concentração do ácido

Ácido nítrico e ácido clorídrico foram selecionados como meio líquido para preparação da suspensão considerando serem reconhecidos e amplamente utilizados na literatura [105,113]. A variação da concentração dos diferentes ácidos com a absorvância é apresentado na Figura 11.

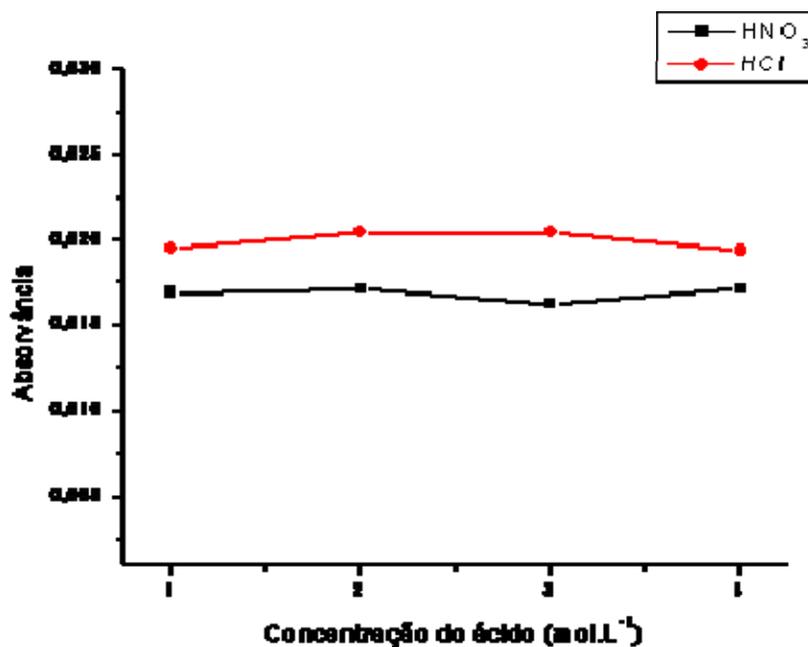


Figura 11- Sinais de absorvância de HCl e HNO₃ em diferentes concentrações. Condições: Sonicação de 20 min; 150 mg de amostra.

Analisando o gráfico, percebe-se que os sinais de absorvância do HCl são um pouco maiores que os obtidos com o uso de HNO₃. Assim, o HCl foi utilizado, além de ser este menos danoso ao equipamento por tratar-se de um ácido não oxidante, evitando maiores problemas às partes oxidáveis do aparelho. Este ácido também minimiza a agregação das partículas além de melhorar a eficiência do transporte de nebulização [105]. A concentração de 2,0 mol.L⁻¹ foi então fixada para etapas posteriores.

7.1.2.2 - Estudo do tempo de sonicação

A faixa estudada para o tempo de sonicação foi definida tendo em vista a diminuição do tempo total de análise e para evitar bloqueio no sistema de nebulização do equipamento. Na Figura 12 são apresentadas as absorvâncias obtidas frente à variação do tempo de sonicação.

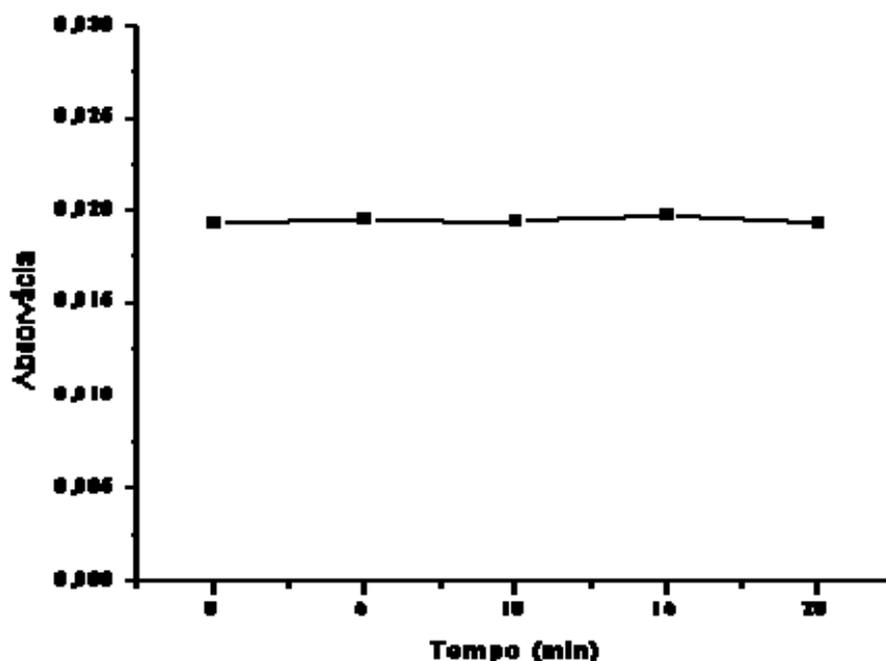


Figura 12- Influência do tempo de sonicação no sinal analítico. Condições: HCl 2,0 mol.L⁻¹; 150 mg de amostra.

Analisando o gráfico, percebe-se que o tempo de sonicação não representa um ganho significativo de sinal analítico. Ocasional bloqueio do sistema de nebulização em tempo inferior a 10 min foi observado durante as medidas, podendo-se concluir que o ultrassom não estava sendo eficiente para desagregar os aglomerados formados no preparo da suspensão no referido tempo. Antes da introdução da amostra era realizada uma agitação manual para auxiliar no processo. Assim, um tempo de 15 min foi estabelecido para etapas futuras.

7.1.2.3 - Massa de amostra

O estudo da massa foi realizado utilizando-se 50 mL de ácido clorídrico 2,0 mol.L⁻¹ e tempo de sonicação de 15 min. O intervalo de massa foi definido a partir de estudos prévios envolvendo problemas relativos ao bloqueio no sistema de nebulização da amostra, citados no item anterior. A Figura 13 mostra a variação da absorvância, no intervalo 50 a 400 mg de amostra .

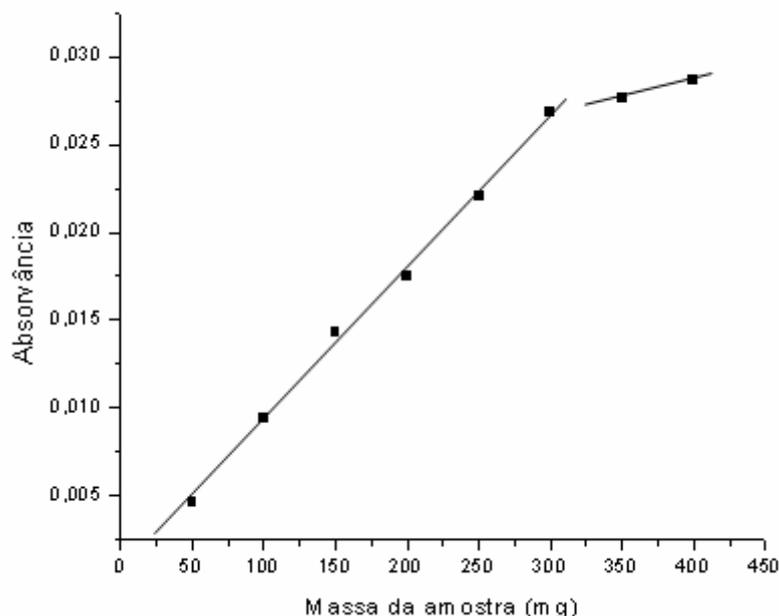


Figura 13- Extensão aplicada para desvio da inclinação. Condições: HCl 2,0 mol.L⁻¹; sonicação de 15 min.

Podemos afirmar, analisando o gráfico, que há uma relação linear entre a quantidade de analito disponível na amostra que é aspirada e absorvância medida até 300 mg. Até esta massa, as medidas podem ser realizadas sem maiores problemas. Entretanto, a partir de 250 mg começam a surgir eventualmente problemas de entupimento resultando, ocasionalmente, na repetição das medidas. Acima de 300 mg problemas sérios de entupimento inviabilizaram consecutivas medidas. Para não trabalhar no limite de desvio da curva, elegeu-se então 200 mg como massa para futuras medidas.

7.1.3 - Procedimento de calibração

Para avaliação da relação entre a concentração do analito na amostra e a absorvância medida foram utilizadas e comparadas as curvas analíticas utilizando padrões aquosos, adição de analito em amostra de chocolate e adição de analito em amostra de farinha de arroz comercial. Nas Figuras 14, 15 e 16 são mostradas as curvas analíticas obtidas frente a cada uma das técnicas de calibração acima mencionadas e na Tabela 6 estão representadas as respectivas equações das retas e coeficiente de correlação.

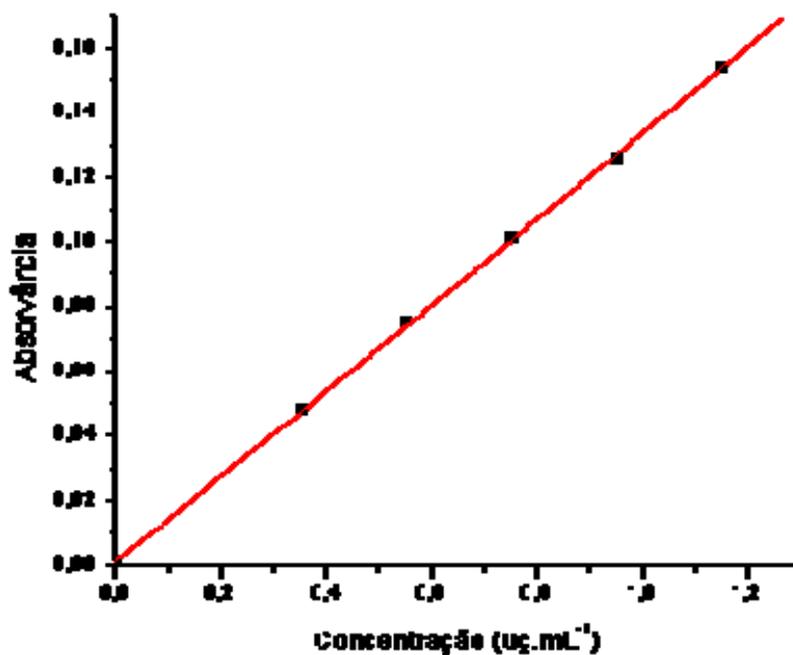


Figura 14- Curva analítica utilizando soluções de Cu^{2+} em meio de HCl 2,0 mol.L⁻¹.

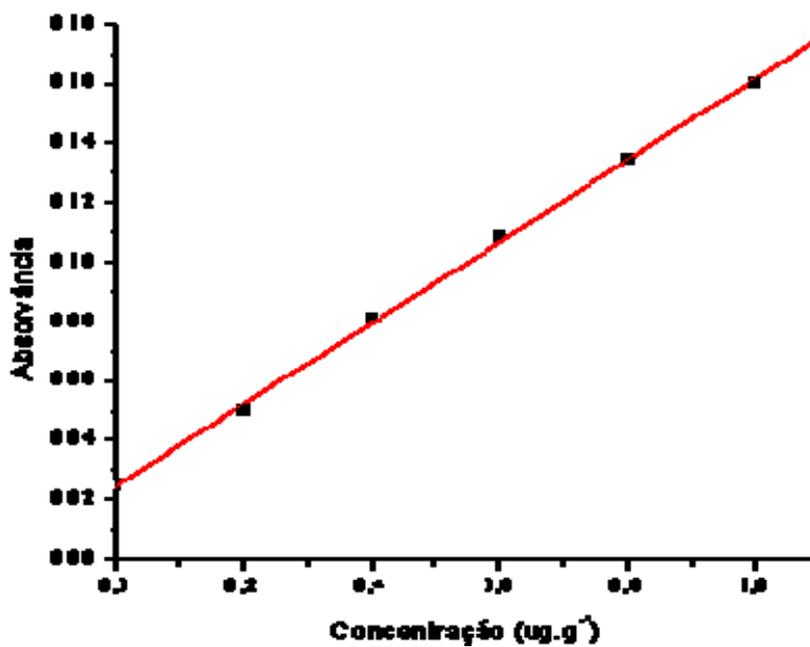


Figura 15- Curva analítica com adição de Cu^{2+} no chocolate.

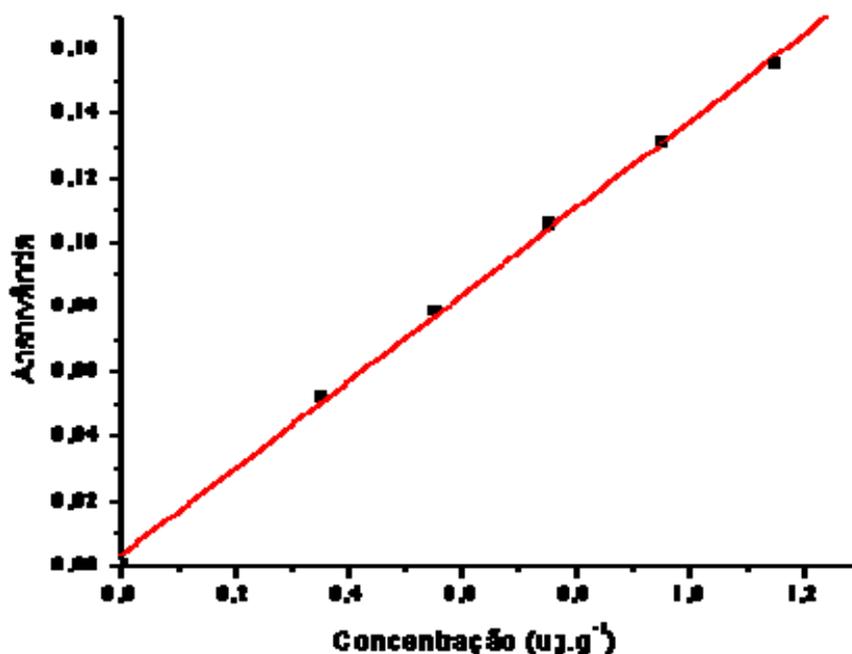


Figura 16- Curva analítica com adição de Cu^{2+} na farinha de arroz.

Tabela 6- Comparação entre equações de calibração para os métodos de calibração obtidos.

Calibração	Equação	R
Padrão aquoso	$A = 0,1329C_{\text{Cu}} + 0,0009$	0,9998
Adição de analito no chocolate	$A = 0,1371C_{\text{Cu}} + 0,0237$	0,9999
Adição de analito na farinha de arroz	$A = 0,1348C_{\text{Cu}} + 0,0036$	0,9991

Interpretando os parâmetros das curvas analíticas pode-se afirmar que a calibração do sistema pode ser efetuada de forma convencional. O coeficiente angular da equação indica a forma como o analito é afetado durante a atomização. Assim, as inclinações obtidas são próximas, indicando que o analito, tanto utilizando calibração convencional quanto adição de analito, é afetado da mesma forma, não havendo efeitos de matriz pronunciados. A curva de adição de analito na farinha de arroz comercial, utilizada para simular a matriz, possui também comportamento semelhante às outras duas curvas obtidas.

7.1.4 - Validação do método

7.1.4.1 - Limite de detecção e quantificação (LD e LQ)

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor massa de analito que pode ser detectada, com determinada certeza estatística. É determinado pela razão entre o desvio padrão do sinal analítico do branco (obtido por no mínimo 10 medidas) multiplicado por um fator de três, dividido pela inclinação da curva analítica [146,155].

$$LD = \frac{3 S_b}{b}$$

O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a menor concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente, com risco de erro de 5%. É matematicamente expresso pela razão entre o desvio padrão do sinal analítico do branco (obtido por no mínimo 10 medidas) multiplicado por um fator de dez, dividido pela inclinação da curva analítica.

$$LQ = \frac{10 S_b}{b}$$

A farinha de arroz comercial foi utilizada por não haver chocolate com baixa quantidade do analito que pudesse ser utilizado como branco. A farinha de arroz então selecionada possui características semelhantes com a matriz em estudo (chamada de matriz simulada) como, por exemplo, origem vegetal e granulometria, além de serem afetadas da mesma maneira durante a atomização, fato este evidenciado pelas inclinações das curvas obtidas. A quantidade de cobre presente estava consideravelmente baixa. Foi preparada então a suspensão a partir de 200 mg de amostra. O LD e o LQ calculados para o cobre a partir de dez medidas ($n = 10$) foram $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente.

7.1.4.2 - Aplicabilidade do método

A faixa dinâmica de trabalho para um determinado método analítico (extensão de aplicabilidade) é a região da curva entre a concentração mais baixa na qual uma medida pode ser feita (LQ) até onde a curva desvia-se da linearidade inicial (Limite de Linearidade, LL) [146]. Na amostragem de suspensão a faixa de trabalho limita-se a linearidade da curva de massa (Figura 13), pois, caso haja uma amostra contendo uma baixa concentração de analito, uma alternativa é aumentar a massa desta amostra na suspensão, fato que dependerá da faixa de linearidade da curva de massa, sendo que esta não deve ser ultrapassada devido a problemas no sistema de nebulização.

7.1.4.3 - Precisão

A precisão de um método reflete a repetibilidade ou reprodutibilidade das medidas em uma mesma amostra. Enquanto a repetibilidade indica a concordância entre os resultados obtidos pelo método sob as mesmas condições (laboratório, operador e equipamento), a reprodutibilidade indica concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo método, porém sob diferentes condições [149]. É calculado a partir da razão entre o desvio padrão das medidas (S_c) e a média das medidas (X_c), expresso em porcentagem como desvio padrão relativo.

$$\text{RSD}\% = \frac{S_c}{X_c} \cdot 100$$

Para as suspensões RSD's aceitáveis são maiores que em soluções líquidas (< 5%). A precisão foi então calculada a partir de dez medidas consecutivas na suspensão da amostra de chocolate. O desvio padrão relativo obtido foi de 2,5% para uma concentração de cobre na amostra de chocolate de $31,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Apesar de aceitáveis, fatores como distribuição das partículas e solubilidade do analito no solvente podem ter influenciado na obtenção do RSD.

7.1.4.4 - Estimativa da exatidão

Reflete a concordância entre o valor esperado (real) e o obtido experimentalmente por um dado método analítico. A checagem da exatidão pode ser feita utilizando-se preferencialmente os seguintes procedimentos: determinação do analito em material de referência certificado, aplicação de método com reconhecida exatidão, aplicação de um método independente e medida do analito por método de adição e recuperação [155]. Não havia material de referência certificado para a matriz em estudo. Optou-se então por utilizar a farinha de arroz certificada devido à semelhança de características da matriz (explicitado no item 7.1.4.1) e pelo fato da arrozina comercial ter a mesma natureza da certificada. Foi realizada também a determinação do analito por método de exatidão reconhecida, onde se optou por fazer a digestão em via úmida. As medidas na solução digerida foram realizadas no FAAS.

Nos dois materiais de referência certificados NIST SRM 1568a e NIES CRM 10-b foram medidas as concentrações de cobre utilizando o método proposto, e os resultados são comparados com os valores certificados. A digestão por via úmida em sistema fechado, foi usada para determinação do analito e detecção em FAAS e as concentrações obtidas são mostradas na Tabela 7. Na tabela estão também as concentrações de cobre obtidas pela metodologia de amostragem de suspensão e detecção por GF AAS. É válido ressaltar que a metodologia foi otimizada de forma univariada, tendo em vista a confiabilidade nos dados das concentrações obtidas pelo método proposto. Algumas características são apresentadas na Tabela 8. Comparação estatística usando teste-t foi utilizado, não mostrando diferença significativa entre os valores obtidos para os métodos propostos e os valores certificados.

Tabela 7- Teores médios e desvios padrão para determinação de Cu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em amostras certificadas e em amostras de chocolate em pó comercial ($n = 3$).

CRM/amostra	Valor	Digestão	Suspensão	Suspensão
	certificado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	em bomba ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	GF AAS ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	FAAS ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
NIST SRM 1568a	$2,4 \pm 0,3$	-	-	$2,5 \pm 0,3$
NIES CRM 10-b	$3,3 \pm 0,2$	-	-	$3,2 \pm 0,4$
Choc. Caseiro	-	$26,6 \pm 0,4$	$26,6 \pm 1,0$	$26,2 \pm 0,4$
Choc. Garoto	-	$29,4 \pm 0,3$	$29,3 \pm 0,8$	$29,6 \pm 0,8$
Choc. Jeanne	-	$31,2 \pm 0,9$	$31,8 \pm 0,5$	$31,5 \pm 0,5$
Choc Caseiro 2	-	$25,5 \pm 0,7$	$26,4 \pm 0,7$	$25,8 \pm 0,6$
Choc. Jeanne 2	-	$30,6 \pm 0,4$	$30,5 \pm 0,8$	$30,9 \pm 0,7$
Choc. Van Houten	-	$48,5 \pm 0,7$	$48,0 \pm 1,1$	$48,7 \pm 0,9$

Tabela 8- Parâmetros operacionais do GF AAS.

Parâmetro	Condição
Modo de medida do sinal	área do pico
Comprimento de onda	324,8 nm
Resolução espectral	0,5 nm
Corrente da lâmpada	5 mA
Volume da amostra	20 μL
Temperatura de pirólise	800°C
Temperatura de Atomização	2500°C

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para saber se havia diferença significativa entre as concentrações obtidas (Tabela 7) utilizando o método proposto, digestão em chapa e medida no FAAS e amostragem de suspensão e medida no GFAAS [156]. Os resultados obtidos na ANOVA são mostrados na Tabela 9, para um nível de confiança de 95%.

Como observado na Tabela 9, o valor de $F < F_{\text{Crítico}}$, ou seja, não há diferença significativa entre o método proposto e os outros dois acima citados, utilizados para checagem da exatidão.

Tabela 9- Análise de variância das concentrações obtidas para o cobre.

SQ	gl	MQ	F	F crítico
0,081111	2	0,040556	0,000587	3,68232

Legenda: SQ: soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados; F: fator F calculado; F crítico: Fator F tabelado.

7.1.5 - Testes complementares

A eficiência de extração do cobre para a solução usando o método proposto foi investigada. O teste é simples e consistiu em preparar a suspensão, HCl 2,0 mol.L⁻¹ e sonicação de 15 min, efetuar a medida da suspensão, levar a mesma à centrífuga por 10 min em 2000 rpm, efetuar a medida novamente apenas do sobrenadante. A relação obtida indica o quanto o meio está sendo eficiente em extrair o cobre para a suspensão. Sob essas condições a extração foi de aproximadamente 90% indicando que, com uma margem de 5% de erro, que o processo não é completo havendo, portanto, necessidade de introdução do material particulado em suspensão para recuperação completa.

A repetibilidade dos sinais de absorvância utilizando Triton X-100 foi investigada visando à diminuição da taxa de sedimentação das partículas assim como evitar a aglomeração, influenciando diretamente a precisão das medidas. O teste consistiu em efetuar trinta medidas consecutivas da suspensão com e sem o agente estabilizante, expresso em RSD. A repetibilidade dos sinais foi de 2,5% e 2,2% sem e com o Triton respectivamente, para uma concentração final de 0,05% v/v. Teste F foi aplicado [156], onde se observou que $F (1,29) < F_{\text{Crítico}} (2,97)$, confirmando que a presença de Triton não melhora de forma significativa a precisão das medidas. Não foi utilizado no preparo das suspensões, pois aumenta um pouco o sinal do branco.

A umidade das amostras esteve em torno de 3%, de acordo com o procedimento descrito no item 6.7.

7.2 - DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS E ZINCO UTILIZANDO AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA MULTIELEMENTAR SEQUÊNCIAL

7.2.1 - Otimização das variáveis

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado com o objetivo de investigar a influência das variáveis envolvidas na amostragem de suspensão. As variáveis envolvidas no processo e os níveis estudados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Variáveis e níveis estudados.

Variáveis	Nível inferior	Ponto central	Nível superior
Concentração do HNO ₃ (mol.L ⁻¹)	1	2,5	4
Concentração de Triton X-100 (% v/v)	0,05	0,10	0,15
Tempo de sonicação (min)	0	10	20

A matriz de planejamento gerada e as respectivas absorvâncias para os três elementos são mostradas na Tabela 11.

O resultado do planejamento fatorial é mostrado nas Figuras 17 e 18 por meio dos diagramas de Pareto respectivamente para manganês e zinco. Nos gráficos são mostrados a probabilidade estatística (p) de 0,05, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 11- Matriz de planejamento 2^3 e respectivas absorvâncias.

Exp	HNO ₃	Triton	TS	Mn	Zn
1	-	-	-	0,0283	0,0884
2	-	-	+	0,0262	0,0846
3	-	+	-	0,0267	0,0928
4	-	+	+	0,0268	0,0877
5	+	-	-	0,0234	0,0708
6	+	-	+	0,0173	0,0691
7	+	+	-	0,0224	0,0693
8	+	+	+	0,0232	0,0701
9	0	0	0	0,0295	0,0907
10	0	0	0	0,0296	0,0894
11	0	0	0	0,0297	0,0919

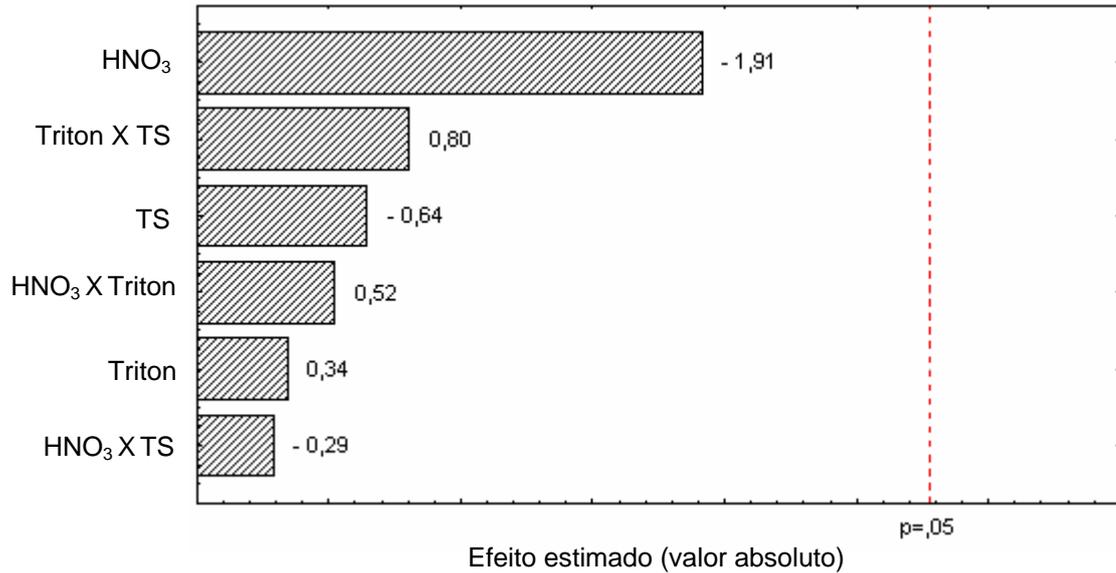


Figura 17- Efeitos estimados para o manganês.

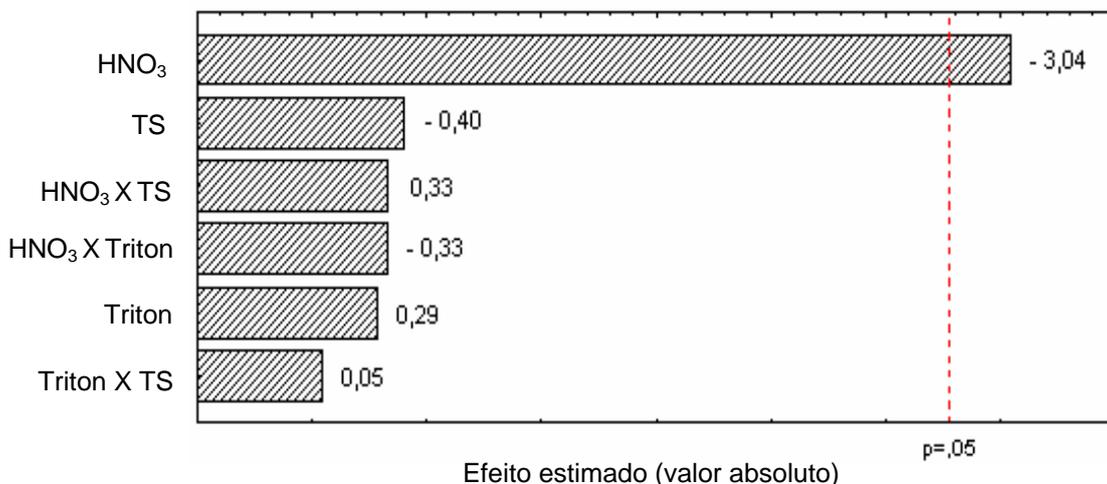


Figura 18- Efeitos estimados para o zinco.

Analisando os diagramas dos efeitos estimados para o manganês percebe-se que as variáveis nos níveis estudados não foram estatisticamente significativas para o manganês. O mesmo não ocorre em relação ao zinco, onde a concentração do HNO₃ mostrou-se significativa. Isso se deve ao fato de a regulagem da altura do queimador ser fixada em relação ao manganês, menos sensível, perdendo um pouco de sinal em relação ao zinco. A concentração de Triton e o tempo de sonicação não são significativos para nenhum dos elementos, pois a taxa de sedimentação e a quantidade de analito disponível no meio são adequadas para as medidas. Com os resultados obtidos, verificou-se então a necessidade de otimização de forma univariada.

7.2.1.2 - Tipo e concentração do ácido

A otimização das variáveis começou com o estudo da natureza do ácido. Esse estudo veio a confirmar os efeitos observados para os metais no diagrama de Pareto. Nas Figuras 19 e 20 são mostradas as variações de absorvância frente aos ácidos clorídrico e nítrico para os dois elementos estudados.

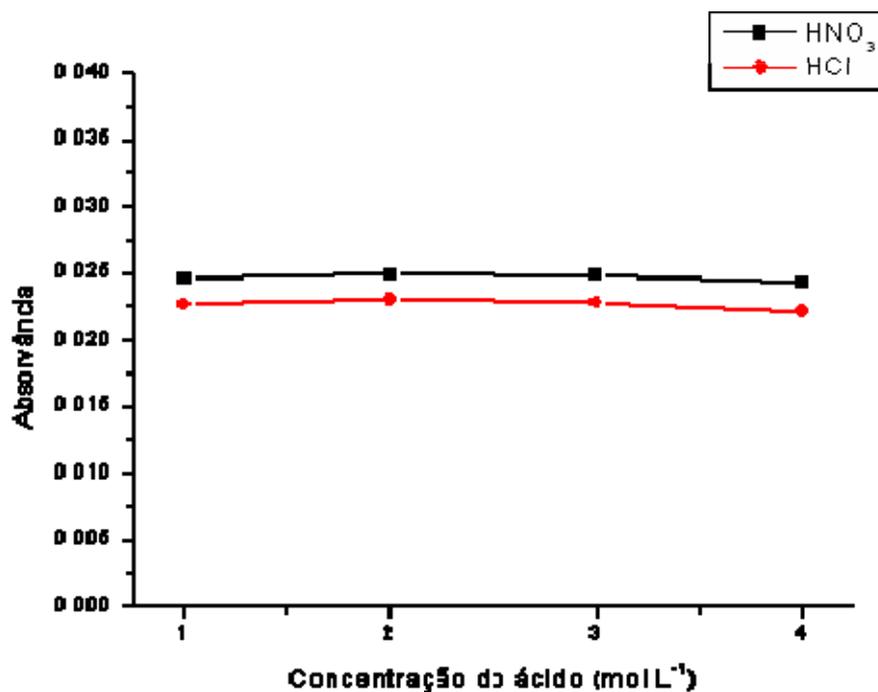


Figura 19- Sinais de absorvância de HCl e HNO₃ em diferentes concentrações para o Mn²⁺. Condições: sonicação de 15 min; 200 mg de amostra.

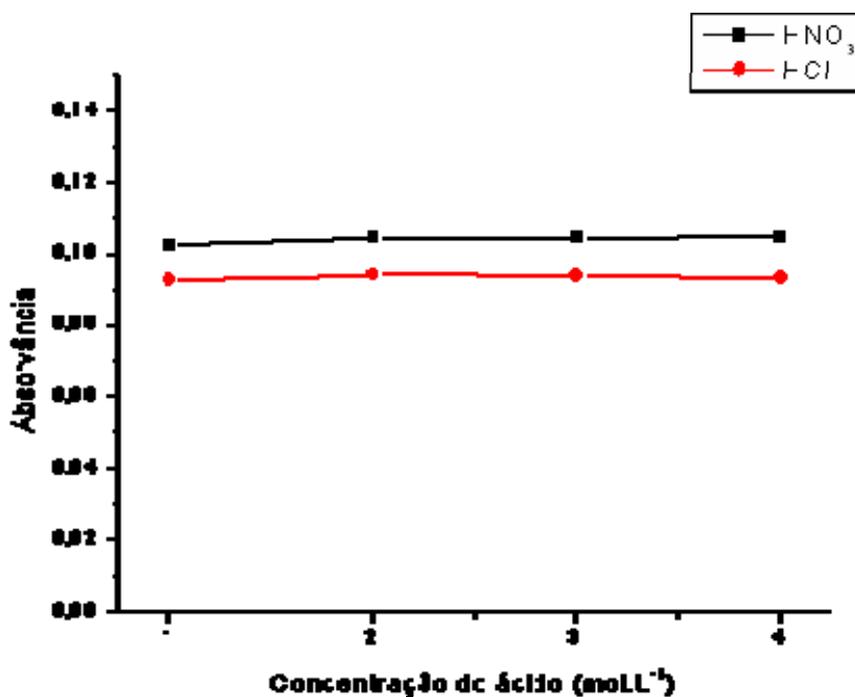


Figura 20- Sinais de absorvância de HCl e HNO₃ em diferentes concentrações para Zn²⁺. Condições: sonicação de 15 min; massa de 200 mg.

Interpretando os gráficos acima, percebe-se que o HNO_3 como meio permite a obtenção de sinais melhores para Mn e para Zn em todas as concentrações estudadas. Foi utilizada para etapas posteriores a concentração de $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de HNO_3 , pois esta foi a condição em que as absorvâncias foram ligeiramente melhores. Suspensões preparadas com HNO_3 $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ provocavam ocasional bloqueio do sistema de nebulização do equipamento.

A limitação do equipamento em relação à altura do queimador (como mencionado no item 7.2.1) já foi resolvida com um sistema integrado automatizado que permite o controle por parte do software de um motor abaixo do queimador/sistema de nebulização onde seriam armazenadas no microcomputador as posições pré-programadas e ideais para cada elemento, comercializados nas versões mais novas do equipamento ou adaptando-se aos em uso (sendo inviáveis devido ao preço).

7.2.1.3 - Estudo do tempo de sonicação

A variação do sinal analítico em função do tempo de sonicação foi estudada para cada um dos elementos, como mostram as Figuras 21 e 22.

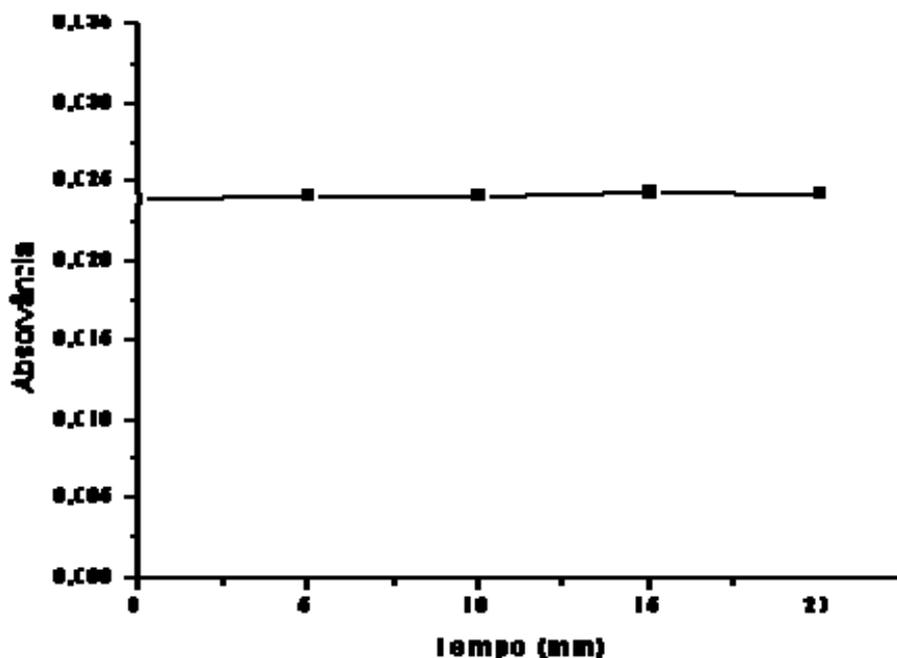


Figura 21- Influência do tempo de sonicação no sinal analítico para o Mn. Condições: HNO_3 $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$; 200 mg de amostra.

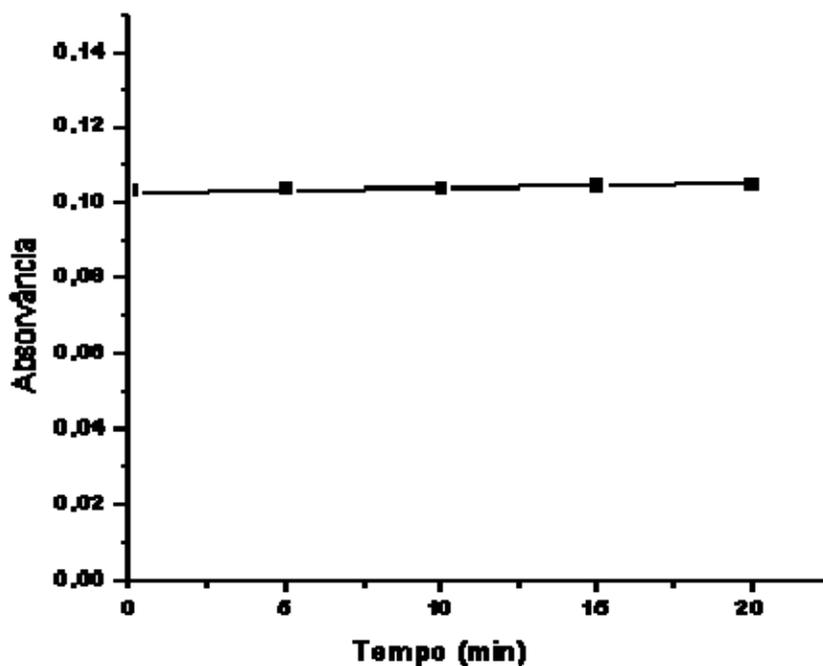


Figura 22- Influência do tempo de sonicação no sinal analítico para o Zn. Condições: HNO_3 2,0 mol.L⁻¹; 200 mg de amostra.

Nos dois gráficos percebe-se que na faixa estudada este parâmetro não influencia significativamente no sinal analítico para ambos os metais. Em 5 e 10 min ocorre, ocasionalmente, entupimento no sistema de nebulização do equipamento, indicando que o processo de desagregação das partículas foi pouco eficiente. Este entupimento foi influenciado também devido a medida ser realizada de forma seqüencial, tendo em vista que devido ao tempo maior para ser realizado as medidas para os dois elementos, ocorre lenta agregação das partículas neste intervalo.

7.2.1.4 - Massa da amostra

A variação do sinal analítico em função da quantidade de amostra para os elementos é mostrada nas Figuras 23 e 24.

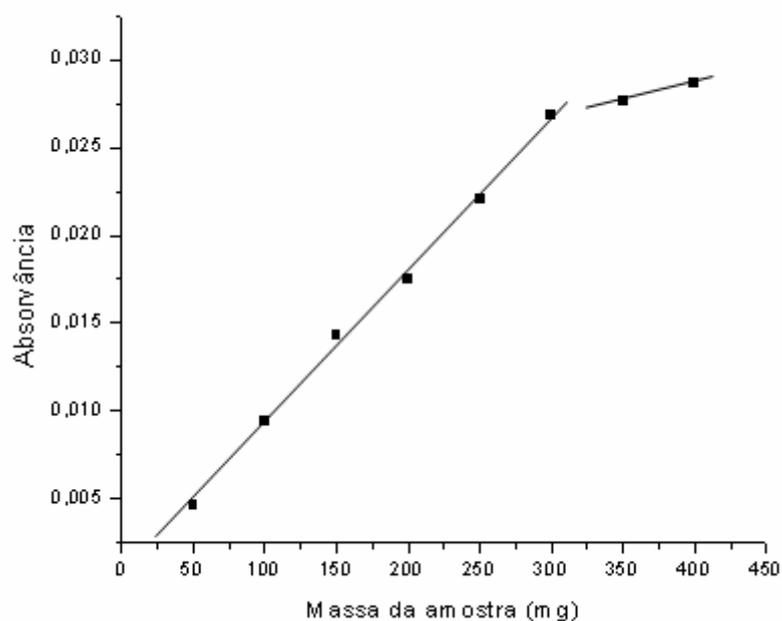


Figura 23- Extensão aplicada para desvio da inclinação para o Mn
Condições: HCl 2,0 mol.L⁻¹; sonicação de 15 min.

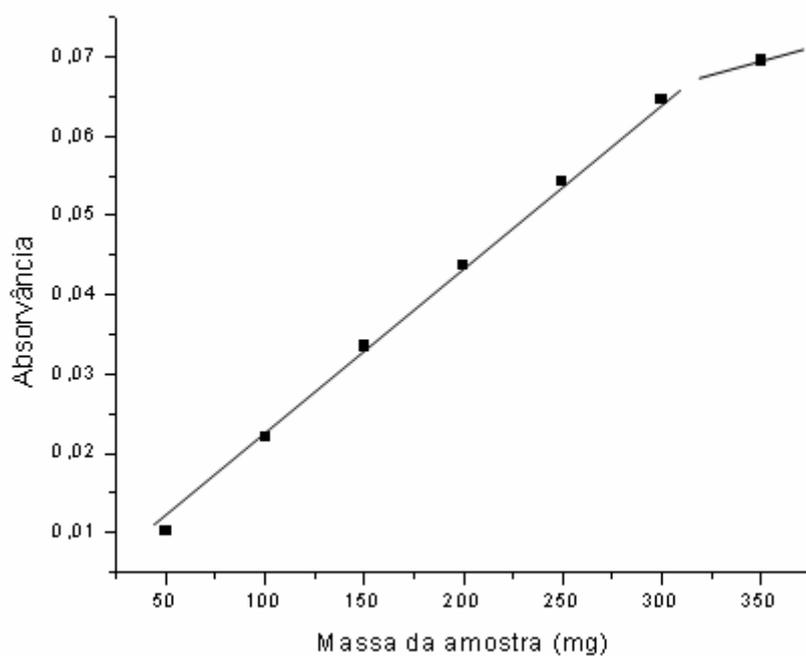


Figura 24- Extensão aplicada para desvio da inclinação para o Zn
Condições: HCl 2,0 mol.L⁻¹; tempo de sonicação 15 min.

Pode-se afirmar a partir dos gráficos que há uma relação linear entre a quantidade de analito disponível na amostra que é aspirada e absorvância medida até 300 mg. Os coeficientes de correlação obtidos são todos maiores do que 0,998, excluindo-se o último ponto (350 mg). Em se tratando de medidas no modo seqüencial, observa-se que quando utilizadas massas a partir de 200 mg começam a surgir problemas de entupimento devido a sedimentação das partículas ocorrer de forma mais rápida do que quando operado no modo convencional, havendo então necessidade de constante agitação para finalização das medidas. A massa então utilizada para as etapas seguintes foi de 150 mg.

7.2.2 - Procedimento de calibração

A avaliação das curvas analíticas obtidas relativas a cada uma das técnicas de calibração são mostradas na Tabela 11, para os elementos manganês e zinco, bem como as respectivas equações das retas.

Os resultados obtidos demonstram que o manganês pode ser calibrado de forma convencional, devido as inclinações das curvas indicarem que durante a atomização são afetados de forma semelhante, diferente do que ocorre com o zinco onde as inclinações para padrão aquoso e adição de analito no chocolate e na farinha de arroz impossibilitam tal calibração. Foi realizada então a calibração do sistema por adição de analito na farinha de arroz comercial cujas concentrações dos elementos são baixas. As curvas analíticas para manganês e zinco estão na faixa de 0,3-1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Tabela 12- Curvas analíticas obtidas com diferentes técnicas de calibração.

Elemento	Calibração	Equação	Coefficiente de correlação
Mn	Padrão inorgânico	$Abs = 0,1971C_{Mn} + 6,2 \cdot 10^{-4}$	0,9994
	Adição de analito no chocolate	$Abs = 0,1958C_{Mn} + 0,0329$	0,9995
	Adição de analito na amostra certificada	$Abs = 0,1936C_{Mn} + 0,0086$	0,9992
	Adição de analito na farinha arroz comercial	$Abs = 0,1947C_{Mn} - 0,0001$	0,9991
Zn	Padrão inorgânico	$Abs = 0,4258C_{Zn} - 0,0077$	0,9987
	Adição de analito no chocolate	$Abs = 0,4513C_{Zn} + 0,1488$	0,9978
	Adição de analito na amostra certificada	$Abs = 0,4562C_{Zn} + 0,0491$	0,9991
	Adição de analito na farinha arroz comercial	$Abs = 0,4587C_{Zn} + 0,0001$	0,9992

7.2.3 - Validação do método

7.2.3.1 - Limite de Detecção e Quantificação

O LD calculado a partir de dez medidas ($n = 10$) da farinha de arroz com baixas concentrações dos metais foi 52 ng.g^{-1} para Mn e 61 ng.g^{-1} para Zn. Apesar de o zinco ser mais sensível do que o manganês deve-se observar que a altura do queimador foi otimizada para o manganês, menos sensível.

O LQ ($n = 10$) calculado foi de $0,17 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ para Mn e $0,20 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ para Zn.

7.2.3.2 - Precisão

O desvio padrão relativo calculado para dez medidas do branco ($n = 10$) foi de 2,6 e 3,2%, respectivamente para manganês e zinco, com concentração de 52,7 e 101,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Mn e Zn em 150 mg de amostra. Tais valores são normalmente maiores no modo seqüencial do que no modo normal, pois em se tratando de suspensões, no intervalo entre as medidas ocorre sedimentação das partículas.

7.2.3.3 - Estimativa da exatidão

Para a estimativa da exatidão por medida do analito no material de referência certificado utilizando o método proposto, foi usada apenas a amostra certificada NIES CRM 10-b rice flour. Comparação com digestão em chapa e em bomba, duas técnicas de reconhecida exatidão, foi realizada e os resultados são mostrados nas Tabelas 13 e 14. Comparação estatística usando test-t foi utilizada, não mostrando diferença significativa entre os valores obtidos para os métodos propostos e os valores certificados.

Tabela 13- Teores médios e desvios padrão para determinação de Mn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na amostra certificada e em amostras de chocolate em pó comercial ($n = 3$).

CRM/amostra	Valor certificado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Digestão em chapa ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Digestão em bomba ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Suspensão no FAAS ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
NIES 10-b	31,5 ± 1,6	-	-	31,0 ± 1,9
Choc. Jeanne	-	52,2 ± 1,1	52,9 ± 1,0	52,7 ± 1,4
Choc. Caseiro	-	50,8 ± 2,1	50,9 ± 0,9	49,2 ± 1,2
Choc. Garoto	-	43,1 ± 2,0	42,6 ± 2,1	42,8 ± 1,2
Choc. Jeanne 2	-	45,1 ± 1,0	45,8 ± 1,7	45,7 ± 1,0
Choc. Caseiro 2	-	49,1 ± 0,7	50,7 ± 1,4	50,2 ± 1,6
Choc. Van Houten	-	39,8 ± 1,0	41,5 ± 1,2	41,1 ± 2,0

Tabela 14- Teores médios e desvios padrão para determinação de Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na amostra certificada e em amostras de chocolate em pó comercial ($n = 3$).

CRM/amostra	Valor certificado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Digestão em chapa ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Digestão em bomba ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Suspensão no FAAS ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
NIES 10-b	23,5 ± 1,2	-	-	22,3 ± 0,9
Choc. Jeanne	-	100,2 ± 1,0	101,2 ± 0,9	101,0 ± 1,4
Choc. Caseiro	-	90,7 ± 1,2	90,4 ± 0,6	88,6 ± 1,5
Choc. Garoto	-	102,3 ± 1,2	102,7 ± 1,1	102,4 ± 1,1
Choc. Jeanne 2	-	88,3 ± 0,9	88,5 ± 1,1	88,8 ± 1,6
Choc. Caseiro 2	-	86,7 ± 1,0	87,0 ± 1,0	86,8 ± 1,4
Choc. Van Houten	-	82,5 ± 1,3	83,0 ± 0,9	83,3 ± 1,2

Análise de variância foi realizada nas concentrações obtidas na Tabela 13 para o manganês e Tabela 14 para o zinco e os resultados encontra-se na Tabela 15.

Tabela 15- Análise de variância das concentrações obtidas para o manganês e o zinco.

Elemento	SQ	gl	MQ	F	F crítico
Mn	1,574444	2	0,787222	0,035627	3,68232
Zn	0,447778	2	0,223889	0,003572	3,68232

Legenda: SQ: soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados; F: fator F calculado; F crítico: Fator F tabelado.

7.2.4 - Testes complementares

Foi realizado o teste de eficiência de extração para o manganês e zinco. As condições são as mesmas do item 6.1.4.5. A extração foi de $\cong 101\%$ para manganês e 95% para zinco indicando que, com uma margem de 5% de erro, o processo é completo não havendo, portanto, necessidade de introdução do material particulado em suspensão para recuperação completa.

A repetibilidade dos sinais de absorvância utilizando Triton X-100 foi investigada visando à diminuição da taxa de sedimentação das partículas assim

como evitar a aglomeração, influenciando diretamente a precisão das medidas. O teste consistiu em efetuar trinta medidas consecutivas da suspensão com e sem o agente estabilizante, expresso em RSD. A reprodutibilidade dos sinais foi de 2,6 e 3,2% sem o Triton X-100 e de 2,1 e 3,0% para manganês e zinco respectivamente em uma concentração final de 0,05% v/v. Teste F aplicado onde se observou que para o manganês $F(1,53) < F_{\text{Crítico}}(2,97)$ e para o zinco $F(1,13) < F_{\text{Crítico}}(2,97)$. Pode-se concluir então que a presença de Triton X-100 não melhora de forma significativa a precisão das medidas não sendo, portanto, utilizado.

7.2.5 - Avaliação dos resultados

As concentrações obtidas, como demonstradas nas Tabelas 7, 13 e 14, variaram de 26,2 a 31,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para cobre, 42,8 a 52,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ manganês e 86,8 a 102,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ zinco, utilizando o método proposto.

Levando-se em conta o limite máximo de tolerância permitido pela legislação brasileira para cobre (30 $\mu\text{g.g}^{-1}$) três amostras encontram-se acima desse limite, como mostrado na Figura 25. Considerando o limite estabelecido para o zinco (50 $\mu\text{g.g}^{-1}$) todas as amostras encontram-se bem acima deste nível, como mostrado na Figura 26. Como dito no item 2.4, a legislação não estabelece os limites máximos de tolerância para o manganês e sim os valores recomendados de ingestão diária de manganês para grupos etários. Um adulto que tem necessidade diária de 5 mg (Tabela 2) deve ingerir do chocolate Jeanne (com maior quantidade de manganês) cerca de 100 g diárias para suprir tais necessidades.

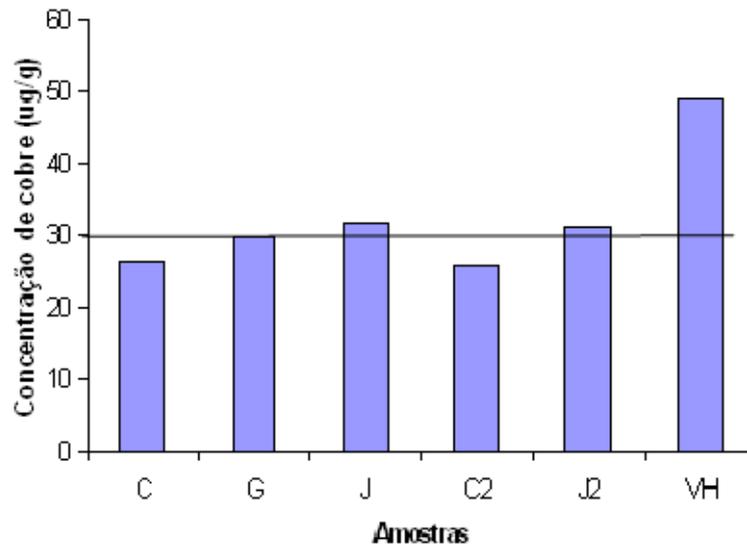


Figura 25- Distribuição de cobre nas amostras de chocolate.

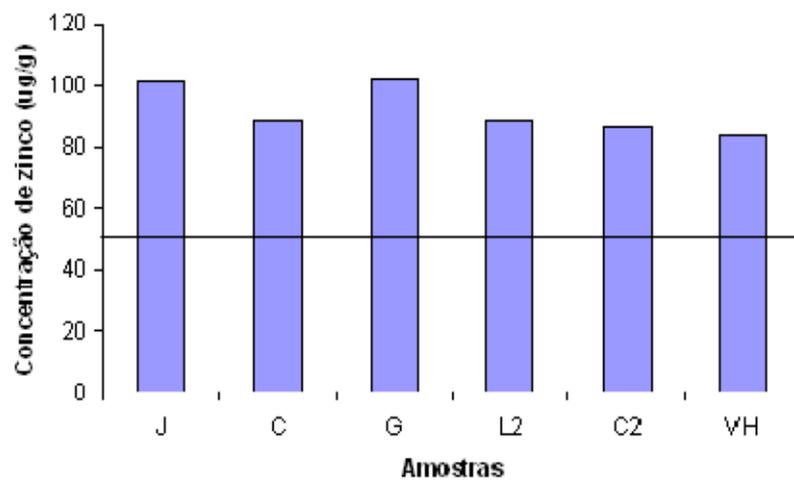


Figura 26- Distribuição de zinco nas amostras de chocolate.

CAPÍTULO 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de amostragem de suspensão desenvolvida mostrou-se um procedimento analítico rápido, com baixo risco de contaminação e menor custo, sendo adequada para aplicações de rotina.

O estudo da significância das variáveis utilizando o planejamento fatorial mostrou-se simples e rápido, permitindo concluir que nenhuma das variáveis nos níveis estudados é significativa, excetuando-se a concentração ácida para o zinco.

As determinações de cobre, manganês e zinco foram realizados com a introdução da amostra diretamente no nebulizador convencional (sem necessidade de adaptações para introdução da suspensão) do espectrômetro de absorção atômica com chama. O equipamento foi operado no modo seqüencial para determinação de manganês e zinco.

Devido à limitação instrumental em relação a altura do queimador, a calibração do equipamento foi realizada em relação ao manganês, menos sensível que o zinco, quando operado no modo seqüencial.

Os parâmetros analíticos mostram-se adequados para determinação de cobre, manganês e zinco, considerando a tolerância em relação à introdução das amostras na forma de suspensão.

Os teores obtidos para cobre encontram-se acima para três amostras considerando os limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, segundo a ANVISA. Os teores de zinco nas amostras encontram-se todos acima dos limites de tolerância estabelecidos.

Considerando as dificuldades em encontrar as amostras de chocolate em pó amargo na região, uma busca em outros estados pode vir a ser feita. Além dos micronutrientes, os macronutrientes também podem vir a serem analisados para servirem de base em tabelas de composição mineral, abem como monitoramento deste alimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COE, S. D. ; COE, M. D. **The True History of Chocolate**. New York, Thames and Hudson, 1996.
- [2] TEUBNER, C; **The Chocolate Bible**. New York, Penguin Studio, 1997.
- [3] Site disponível em: <http://www.candyusa.org/chocstry.html>. Acesso em: 25 set 2005.
- [4] Site disponível em: <http://www.exploratorium.edu/chocolate>. Acesso em: 25 set 2005.
- [5] KARADJOVA, I.; GIROUSI, S.; ILIADOU, E.; STRATIS, I. Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in milk, cheese and chocolate. **Mikrochim. Acta**, v. 134, n. 3, p. 185-191, 2000.
- [6] DOS SANTOS, W. N. L.; DA SILVA, E. G. P.; FERNANDES, M. S.; ARAUJO, R. G. O.; COSTA, A. C. S.; VALE, M. G. R.; FERREIRA, S. L. C.; Determination of copper in powdered chocolate samples by slurry-sampling flame atomic-absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 382, n. 4, p. 1099-1102, 2005.
- [7] SEPE, A.; COSTANTINI, S.; CIARALLI, L.; CIPROTTI, M.; GIORDANO, R. Evaluation of aluminium concentrations in samples of chocolate and beverages by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Addit. Contam.** v. 18, n. 9, p. 788-796, 2001.
- [8] KOHIYAMA, M.; KANEMATSU, H.; NIIYA, I. Heavy metals, particularly nickel, contained in cacao beans and chocolate. **J. Japanese Soc. food Sci. Tech.** v. 39, n. 7, p. 596-600, 1992.

- [9] RANKIN, C. W.; NRIAGU, J. O.; AGGARWAL, J. K.; AROWOLO, T. A.; ADEBAYO, K.; FIEGAL, A. R. Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination. **Environm. Health Perspectives**, v. 113, n. 10, p. 1344-1349, 2001.
- [10] LIMA, J. S. Influence of treatments with cupric fungicides on the mineral composition of cocoa trees. **Agrotropica**. v. 5, n. 3, p. 43-51, 1993.
- [11] Site disponível em: <http://www.ceplac.com.br/album>. Acesso em: 26 set 2005.
- [12] Site disponível em: <http://www.orlandocruz.com.br> . Acesso em: 26 set 2005.
- [13] LELLIS, W. T.; FIGUEIREDO, J. M. de; PEREIRA, J. L. M. Progressos no controle químico da podridão parda do cacau na Bahia, Brasil. **Theobroma** v. 13, n. 2, p. 105-111, 1983.
- [14] SANTANA, C. J. L. de; IGUE, K. Formas de micronutrientes em solos da região cacauera da Bahia. **Turrialba** v. 22, n. 1, p. 73-80, 1972.
- [15] Rocha, M.; Malavolta, E. **Perspectivas de demanda, comercialização e produção industrial de enxofre e micronutrientes para a agricultura**. In: Simpósio sobre enxofre e micronutrientes na agricultura brasileira, EMBRAPA / CNPSo, IAPAR, SBCS. Anais, Londrina, p. 277-309, 1986.
- [16] RAM, A. **Doenças do cacau e seu controle**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, 1983.
- [17] COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. **Vassoura de bruxa**. Fundação Cargill, Campinas, 1993.
- [18] VELOSO, J. L. M.; SANTANA, C. J. L. de; Cobre residual em plantações de cacau. **Agrotropica**. v. 12, n. 2, p. 75-80, 2000.

- [19] OLIVEIRA, E. de; Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.
- [20] FLORES, E. M. M.; SAIDELLES, A. P. F.; FLORES, E. L. M.; MESKO, M. F.; PEDROSO, M. P.; DRESSLER, V. L.; BITTENCOURT, C. F.; COSTA, A. B. DA. Determination of copper in medicinal plants used as dietary supplements by atomic absorption spectrometry with direct flame solid analysis. **Microchem. J.** v. 77, n. 2, p. 113-118, 2004.
- [21] SILVA, M. M.; VALE, M. G. R.; DAMIN, I. C. F.; WELZ, B.; MANDAJI, M.; FETT, J. P.; Method development for the determination of iron in milligram amounts of rice plants (*Oryza sativa* L.) from cultivation experiments using graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 377, n. 1, p. 165-172, 2003.
- [22] CAL-PRIETO, M. J.; FELIPE-SOTELO, M.; CARLOSENA, A.; ANDRADE, J. M.; LOPEZ-MAHIA, P.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**, v. 56, n. 1, p. 1-51, 2002.
- [23] MATUSIEWICZ, H.; Chemical vapor generation with slurry sampling: A review of atomic absorption applications. **Appl. Spectrosc. Rev.** v. 38, n. 3, p. 263-294, 2003.
- [24] BRADY, D. V.; MONTALVO, J. G.; GLOWACKI, G.; PISCIOTA, A. Direct determination of zinc in sea-bottom sediments by carbon tube atomic absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 70, n. 2, p. 448-452, 1974.
- [25] BRADY, D. V.; MONTALVO, J. G.; JUNG, J.; CURRAN, R. A. Direct determination of lead in plant leaves via graphite furnace atomic absorption. **At. Absorpt. Newslett.** v. 13, n. 5, p. 118-119, 1974.
- [26] STEPHEN, S. C.; LITTLEJOHN, D.; OTTAWAY, J. M.; Evaluation of a slurry technique for the determination of lead in spinach by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**, v. 110, n. 9, p. 1147-1151, 1985.

- [27] FRY, R. C.; DENTON, M. B. High solids sample introduction for flame atomic absorption analysis. **Anal. Chem.** v. 49, n. 9, p. 1413-1417, 1977.
- [28] SUDDENDORF, R. F.; BOYER, K. W. Nebulizer for analysis of high salt content samples with inductively coupled plasma emission spectrometry. **Anal. Chem.** v. 50, n. 13, p. 1769-1771, 1978.
- [29] WOLCOTT, J. F.; SOBEL, C. B. A simple nebulizer for an inductively coupled plasma system. **Appl. Spectrosc.** v. 32, n. 6, p. 591-593, 1978.
- [30] MOHAMED, M.; FRY, R. C. Slurry atomization direct atomic spectrochemical analysis of animal tissue. **Anal. Chem.** v. 53, n. 3, p. 450-455, 1981.
- [31] BENDICHO, C.; DE LOOS VOLLEBREGT, M. T. C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption spectrometry using commercial atomizers. A review. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 6, n. 5, p. 353-374, 1991.
- [32] KURFÜST, U. **Solid Sample Analysis. Direct and slurry sampling using GF AAS and ETV-ICP.** Berlin, Springer-Verlag, 1998.
- [33] HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; LÓPEZ-GARCÍA, I. A fast method for determination of lead in Paprika by electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sample introduction. **Talanta**, v. 38, n. 1, p. 1247-1251, 1991.
- [34] SANTOS, C.; ALAVA-MORENO, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Total As in seafood as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: An evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion methods. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 15, n. 8, p. 987-994, 2000.
- [35] MILLER-IHLI, N. J. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fresenius' J. Anal Chem.** v. 345, n. 7, p. 482-489, 1993.

- [36] BENDICHO, C.; DE LOOS VOLLEBREGT, M. T. C. The influence of pyrolysis and matrix modifiers for analysis of glass materials by GF AAS using slurry sample introduction. **Spectrochim. Acta B**, v. 45, n. 7, p. 679-693, 1990.
- [37] MILLER-IHLI, N. J. Influence of slurry preparation on the accuracy of ultrasonic slurry electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 9, n. 10, p. 1129-1134, 1994.
- [38] BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. Palladium as a chemical modifier for the determination of mercury in marine sediment slurries by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 296, n. 2, p. 181-193, 1994.
- [39] VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; LÓPEZ-GARCIA, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Analysis of copper in biscuits and bread using a fast-program slurry electrothermal atomic absorption procedure. **J. Agric. Food Chem.** v. 41, n. 1, p. 2024-2027, 1993.
- [40] DONG, H. M.; KRIVAN, V.; WELZ, B.; SCHLEMMER, G. Determination of trace impurities in titanium dioxide by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta B**, v. 52, n. 12, p. 1747-1762, 1997.
- [41] CABRERA C.; LORENZO, M. L.; LÓPEZ, M. C. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of cadmium, copper, iron, lead, and selenium in fruit Slurry: analytical application to nutritional and toxicological quality control. **J. AOAC Int.** v. 78, n. 4, p. 1061-1067, 1995.
- [42] ROBLES, L. C.; ALLER, A. J. Determination of cadmium in biological and environmental samples by slurry electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 42, n. 11, p. 1731-1744, 1995.
- [43] BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; BERMEJO-BARRERA, A. Determination of traces of silver in human scalp hair

slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Mikrochim. Acta**, v. 129, n. 1, p. 71-76, 1998.

[44] SCHNEIDER, G.; KRIVAN, V. Slurry and liquid sampling using electrothermal atomic absorption spectrometry for the analysis of zirconium dioxide based materials. **Spectrochim Acta B**, v. 50, n. 13, p. 1557-1571, 1995.

[45] MAGALHÃES, C. E. C.; LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; ARRUDA, M. A. Z. Direct analysis of coffee and tea for aluminium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Mikrochim. Acta**, v. 132, n. 1, p. 95-100, 1999.

[46] TAKUWA, D. T.; SAWULA, G.; WIBETOE, G.; LUND, W. Determination of cobalt, nickel and copper in flowers, leaves, stem, and roots of plants using ultrasonic slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 12, n. 8, p. 849-854, 1997.

[47] LÓPEZ-GARCIA, I.; VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of selenium in seafoods using electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sampling introduction. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, n. 3, p. 836-841, 1996.

[48] CARNEIRO, M. C.; CAMPOS, R. C.; CURTIUS, A. J. Determination of Sb, Ni and V in slurry from airborne particulate material collected on filter by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1815-1822, 1993.

[49] SILVA, M. M.; GORETI, M. R. V.; CAMARÃO, E. B.; Slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry: determination trace of metals in mineral coal **Talanta**, v. 50, n. 5, p. 1035-1043, 1999.

[50] LYNCH, S.; LITTLEJOHN, D. Development of a slurry atomization method for the determination of cadmium in food samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 37, n. 8, p. 825-830, 1990.

- [51] BORGES, S. S.; KORN, M. Geração sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono. **Quím. Nova**, v. 25, n. 4, p. 558-562, 2002.
- [52] LIMA, E. C.; BARBOSA JR, F.; KRUG, F. J. Tungsten-rhodium permanent chemical modifier for lead determination in sediment slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 14, n. 12, p. 1913-1918, 1999.
- [53] LÓPEZ-GARCIA, I.; SÁNCHEZ-MERLOS, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of mercury in soils and sediments by graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. **Spectrochim. Acta B**, v. 52, n. 14, p. 2085-2092, 1997.
- [54] MIERZWA, J.; SUN, Y. C.; YANG, M. H. Determination of chromium, manganese and vanadium in sediments and soils by modifier-free slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta B**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 1998.
- [55] LÓPEZ-GARCIA, I.; SÁNCHEZ-MERLOS, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Slurry sampling device for use in electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 12, n. 7, p. 777-779, 1997.
- [56] BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. Determination of nickel in human scalp hair by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 349, n. 3, p. 319-325, 1997.
- [57] TSALEV, D. L.; SLAVEYKOVA, V. I.; LAMPUGNANI, L.; D'ULIVO, A.; GEORGIEVA, R. Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry – advances, anticipations and reality. **Spectrochim. Acta B**, v. 55, n. 5, p. 473-490, 2000.

[58] BRASIL. Decreto nº 55871, 26 de março de 1965. Modifica o decreto nº 50040 de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterados pelo Decreto nº 691 de 13 de março de 1962. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 de março de 1965.

Site disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm. Acesso em 20 jan 2006.

[59] BRASIL. Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998. Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico: “Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos” e seu anexo: “Limites Máximos de Tolerância para Contaminantes Inorgânicos”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 de setembro de 1998.

Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm. Acesso em: 20 jan 2006.

[60] BRASIL. Portaria nº 33 de 13 de Janeiro de 1998. Dispõe sobre a adoção de Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas, minerais e proteínas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/33_98.htm. Acesso em: 20 jan 1998.

[61] RAHMAN, M. A.; KANECO, S.; SUZUKI, T.; KATSUMATA, H.; OHTA, K. Slurry sampling techniques for the determination of lead in Bangladesh fish samples by electrothermal atomic absorption spectrometry with a metal tube atomizer. **Annali di Chimica**, v. 95, n. 5, p. 325-333, 2005.

[62] CHEN, S. Electrothermal vaporization in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for direct multielement analysis of food samples with slurry sampling. **J. Anal. Chem.** v. 60, n. 3, p. 254-258, 2005.

[63] ARAUJO, R. G. O.; DIAS, F. de S.; MACEDO, S. M.; dos SANTOS, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. Method development for the determination of manganese in wheat flour by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry. **Food Chem.**

Article in Press, Corrected Proof. Available online 5 December 2005.

[64] CHEN, S.; LU, D.; XU, Q.; Electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for direct multielement analysis of solid food sample with slurry sampling. **Canadian J. Anal. Sci. Spectrosc.** v. 49, n. 5, p. 290-295, 2004.

[65] RAHMAN, M. A.; KANECO, S.; SUZUKI, T.; KATSUMATA, H.; OHTA, K. Slurry sampling for direct analysis of lead in Bangladesh vegetable samples by molybdenum electrothermal atomizer atomic absorption spectrometry. **New Tech. & Medicine.** v. 5, n. 4, p. 363-368, 2004.

[66] BARALKIEWICZ, D.; EL-SAYED, U.; FILIPIAK, M.; GRAMOWSKA, H.; MLECZEK, M. Determination of selenium in infant foods using electrothermal atomic absorption spectrometry with direct slurry sample introduction. **Central European J. Chem.** v. 2, n. 2, p. 334-346, 2004.

[67] MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. Simultaneous determination of macro and trace elements in biological reference materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction. **Spectrochim. Acta B**, v. 59, n. 5, p. 749-754, 2004.

[68] CAVA-MONTESINOS, P.; RODENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; LUISA CERVERA, M.; DE LA GUARDIA, M. Cold vapor atomic fluorescence determination of mercury in milk by slurry sampling using multicommutation. **Anal. Chim. Acta**, v. 506, n. 2, p. 145-153, 2004.

[69] AMIN, M. D. N.; KANECO, S.; SUZUKI, T.; OHTA, K. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of cadmium in Bangladesh vegetables with a metal tube atomizer and slurry sampling technique. **Intern. J. Environm. Anal. Chem.** v. 83, n. 12, p. 1035-1044, 2003.

[70] LI, S. Q.; WANG, L.; HU, B.; JIANG, Z. C. Direct determination of copper, zinc and manganese in food samples by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fenxi Kexue Xuebao**, v. 18, n. 2, p. 105-110, 2002.

[71] SANTOS, D.; BARBOSA, F.; TOMAZELLI, A. C.; KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; ARRUDA, M. A. Z. Determination of Cd and Pb in food slurries by GF AAS using cryogenic grinding for sample preparation. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 373, n. 3, p. 183-189, 2002.

[72] MENDEZ, H.; ALAVA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Determination of selenium in marine biological tissues by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry with longitudinal Zeeman background correction and automated ultrasonic slurry sampling. **J. Aoac Intern.** v. 84, n. 6, p. 1921-1926, 2001.

[73] VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; LOPEZ-GARCIA, I.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Rapid determination of mercury in food colorants using electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sample introduction. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, n. 5, p. 949-954. 2002.

[74] VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; LOPEZ-GARCIA, I.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Slurry atomisation for the determination of arsenic, cadmium and lead in food colourants using electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 16, n. 10, p. 1202-1205, 2001.

[75] VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Determination of aluminium and chromium in slurried baby food samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Aoac Intern.** v. 84, n. 4, p. 1186-1193, 2001.

[76] VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; LOPEZ-GARCIA, I.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Determination of mercury in baby food and seafood samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **J. Anal. At.**

Spectrom. v. 16, n. 6, p. 633-637, 2001.

[77] VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Determination of copper, cobalt, nickel, and manganese in baby food slurries using electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, n. 12, p. 5789-5794, 2000.

[78] BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PINEIRO, A.; MOREDA-PINEIRO, J.; KAUPPILA, T.; BERMEJO-BARRERA, A. Slurry sampling for electrothermal AAS determination of cadmium in seafood products. **At. Spectrosc.** v. 21, n. 1, p. 5-9, 2000.

[79] VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead, and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Anal. Chim. Acta**, v. 412, n. 2, p. 121-130, 2000.

[80] VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Slurry atomization for the determination of arsenic in baby foods using electrothermal atomic absorption spectrometry and deuterium background correction. **J. Anal. At. Spectrosc.** v. 14, n. 8, p. 1215-1219, 1999.

[81] GONZALEZ, M.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Determination of nickel, chromium and cobalt in wheat flour using slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 48, n. 5, p. 1051-1060, 1999.

[82] MIERZWA, J.; SUN, Y. C.; CHUNG, Y. T.; YANG, M. H. Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurry sampling electrothermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v. 47, n. 5, p. 1263-1270, 1998.

[83] CHEN, S. F.; JIANG, S. J. Determination of arsenic, selenium and mercury in fish samples by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 13, n. 7, p. 673-677, 1998.

[84] TAN, Y.; BLAIS, J. S.; MARSHALL, W. D. Slurry preparation by high-pressure homogenization for the determination of heavy metals in zoological and botanical certified reference materials and animal feeds by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**, v. 121, n. 10, p. 1419-1424, 1996.

[85] FU, X.; QIU, Y.; LUO, L. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of cadmium in rice powder by slurry sample introduction. **Fenxi Huaxue**, v. 23, n. 9, p. 1109-1112. 1995.

[86] VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; LOPEZ-GARCIA, I.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Rapid procedures for cobalt and nickel determination in slurried food samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **At. Spectrosc.** v. 16, v. 2, p. 86-89, 1995.

[87] MATUSIEWICZ, H.; STURGEON, R. E. Slurry sample introduction with microwave induced plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochim. Acta B**, v. 48, n. 5, p. 723-727, 1993.

[88] HU, B.; JIANG, Z.; ZENG, Y. Slurry sampling and fluorination-electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for the direct determination of molybdenum in food. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 6, n. 8, p. 623-626, 1991.

[89] BUTCHER, D. J.; IRWIN, R. L.; TAKAHASHI, J.; SU, G.; WEI, G. T.; MICHEL, R. G. Determination of thallium, manganese, and lead in food and agricultural standard reference materials by electrothermal atomizer laser-excited atomic fluorescence and atomic absorption spectrometry with slurry sampling. **Appl. Spectrosc.** v. 44, n. 9, p. 1521-1533, 1990.

[90] MADRID, Y.; BONILLA, M.; CAMARA, C. Determination of lead in foods and biological samples by hydride generation atomic absorption spectrometry using an aqueous slurry technique. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 4, n. 2, p. 167-169, 1989.

[91] SALVADOR, A.; DE LA GUARDIA, M.; MAURI, A. Direct determination of calcium in food slurries by flame atomic absorption spectroscopy. **At. Spectrosc.** v. 9, n. 6, p. 195-198, 1988.

[92] OLAYINKA, K. O.; HASWELL, S. J.; GRZESKOWIAK, R. Development of a slurry technique for the determination of cadmium in dried foods by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrosc.** v. 1, n. 4, p. 297-300, 1986.

[93] LITTLEJOHN, D.; STEPHEN, S. C.; OTTAWAY, J. M. Slurry sample introduction procedures for the analysis of foods by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Anal. Proceedings**, v. 22, n. 12, p. 376-378, 1985.

[94] FAGIOLI, F.; LANDI, S. Evaluation of a new method for the determination of elements in vegetable foods and feeds by atomic absorption spectroscopy with sampling of carbonaceous slurry. **Anal. Lett.** v. 16, n. 18, p. 1435-1447, 1983.

[95] ALEIXO, P. C.; SANTOS, D.; TOMAZELLI, A. C.; RUFINI, I. A.; BERNDT, H. KRUG, F. J. Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. **Anal. Chim. Acta**, v. 512, n. 2, p. 329-337, 2004.

[96] CAVA-MONTESINOS, P.; CERVERA, P. L.; DE LA GUARDIA, M. Determination of As, Sb, Se, Te and Bi in milk by slurry sampling hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 62, n. 1, p. 175-184, 2004.

[97] RIBEIRO, A. S.; MORETTO, A. L.; ARRUDA, M. A. Z.; CADORE, S. Analysis of powdered coffee and milk by ICPOES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. **Mikrochim. Acta**, v. 141, n. 3, p. 149-155, 2003.

- [98] NARUKAWA, T.; Benzene extraction and cobalt(III) oxide powder collection for the determination of total selenium in food and biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using a tungsten furnace. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 14, n. 12, p. 1919-1923, 1999.
- [99] CARLOSENA, A.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Evaluation of various sample preparation procedures for the determination of chromium, cobalt and nickel in vegetables. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 14, n. 4, p. 479-486, 1997.
- [100] CABRERA, C.; LORENZO, M. L.; LOPEZ, M. C. Lead and cadmium contamination in dairy-products and its repercussion on total dietary-intake. **J. Agric. Food Chem.** v. 43, n. 6, p. 1605-1609, 1995.
- [101] TAHVONEN, R.; KUMPULAINEN, J. Determination of lead at low concentrations in food samples by electrothermal atomic-absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrosc.** v. 9, n. 12, p. 1427-1432, 1994.
- [102] MOKGALAKA, N. S.; MCCRINDLE, R. I.; BOTHA, B. M. Multielement analysis of tea leaves by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using slurry nebulization. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 19, n. 10, p. 1375-1378, 2004.
- [103] CHEN, J.; WU, Y. W.; JIANG, Z. C.; HU, B. Cation exchange micro column combined with fluorination-assisted electrothermal vaporization ICP-AES for the speciation of aluminum in tea leaves. **At. Spectrosc.** v. 24, n. 3, p. 93-97, 2003.
- [104] STEPHEN, S. C.; OTTAWAY, J. M.; LITTLEJOHN, D. Slurry atomization of food in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Zeitschrift Fuer Analytische Chemie**, v. 328, n. 4, p. 346-353, 1987.
- [105] VIÑAS P.; CAMPILLO N.; LÓPEZ GARCÍA, I.; HERNÁNDEZ CÓRDOBA, M. Flow-injection flame atomic absorption spectrometry for slurry atomization. Determination of calcium, magnesium, iron, zinc and manganese in vegetables. **Anal. Chim. Acta**, v. 283, n. 1, p. 393-400, 1993.

[106] LOPEZ, F. F.; CABRERA, C.; LORENZO, M. L.; LOPEZ, M. C. Aluminum content in foods and beverages consumed in the Spanish diet. **J. Food Sci.** v. 65, n. 2, p. 206-210, 2000.

[107] ANTHEMIDIS, A. N.; PLIATSIKA, V. G. On-line slurry formation and nebulization for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Multi-element analysis of cocoa and coffee powder samples. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 20, n. 11, p. 1280-1286, 2005.

[108] ALVES, F. L.; JARDIM, W. F.; CADORE, S.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego da amostragem de suspensão na determinação de Cu e Zn em lapa antártica e Ni em sedimento de rio por espectrometria de absorção atômica com chama. **Quím. Nova**, v. 24, n. 6, p. 756-760, 2001.

[109] ALVES, F. L.; SMICHOWSKI, P.; FARIAS, S.; MARRERO, J.; ARRUDA, M. A. Z. Direct analysis of antarctic krill by slurry sampling: Determination of copper, Iron, manganese, and zinc by flame atomic absorption spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 11, n. 4, p. 365-370, 2000.

[110] JANUZZI, G. S. B.; KRUG, F. J.; ARRUDA, M. A. Z. Application of the slurry technique to the determination of selenium in fish samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 12, n. 3, p. 375-378, 1997.

[111] ARRUDA, M. A. Z.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Automatic preparation of milk dessert slurries for the determination of trace amounts of aluminium by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 10, n. 1, p. 55-59, 1995.

[112] LIMA, E. C.; BARBOSA JR, F.; KRUG, F.J.; SILVA, M. M.; VALE, M. G. R. Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, copper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 15, n. 8, p. 995-1000, 2000.

[113] RÍO-SEGADE, S.; BENDICHO, C. Slurry sampling combined with ultrasonic pretreatment for total mercury determination in simples containing inorganic and methylmercury by flou injection cold vapor atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrosc.** V. 14, n. 12, p. 1907-1912, 1999.

[114] LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; FERREIRA, A. T.; BARBOSA JR, F. Tungsten-Rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in fish slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 14, n. 2, p. 269-274, 1999.

[115] MEERAVALI, N. M.; KUMAR, S. J. Rapid slurry atomization using transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of cadmium, copper, manganese and lead in biological reference materials. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 13, n. 7, p. 647-652, 1998.

[116] LYNCH, S.; LITTLEJOHN, D. Palladium as a chemical modifier for the determination of lead in food slurries by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 4, n. 2, p. 157-161, 1989.

[117] MADRID, Y.; BONILLA, M.; CÂMARA, C. Evaluation of oxidant media for the determination of lead in food slurries by hidride generation atomic absorption spectrometry. **Analyst**, v. 115, n. 5, p. 563-565, 1990.

[118] BIN, H.; ZUCHENG, J.; YUNE, Z. Direct determination of aluminium in biological materials by electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with polytetrafluoroethylene as chemical modifier. **Anal. Chim. Acta**, v. 296, n. 2, p. 213-218, 1994.

[119] PETRUCCI, G.; VAN LOON, J. C. Flame atomic absorption and ICP atomic emission spectroscopic determination of Cu, Zn and Cd in solid suspensions of biological simples. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 326, n. 4, p. 345-349, 1987.

- [120] CARBONELL, V.; MORALES-RUBIO, A.; SALVADOR, A.; DE LA GUARDIA M.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Atomic absorption spectrometric analysis of solids with on-line microwave-assisted digestion. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 7, n. 7, p. 1085-1089, 1992.
- [121] ARRUDA, M. A. Z.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Determination of selenium in fruit juices by flow injection electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 9, n. 5, p. 657-662, 1994.
- [122] MILLER-IHLI, N. J. Trace element determinations in biologicals using atomic absorption spectrometry. **J. Research of National Bureau Standards.** v. 93, n. 3, p. 350-354, 1988.
- [123] ARRUDA, M. A. Z.; FOSTIER, A. H.; KRUG, F. J. On-line microwave-assisted sample decomposition for lead determination in fish slurry samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 8, n. 1, p. 39-45, 1997.
- [124] CHEN, X.; MARSHALL, W. D. Enzymatic digestion-high-pressure homogenization prior to slurry introduction graphite furnace atomic absorption spectrometry for selenium determination in plant and animal tissues. **J. Agric. Food. Chem.** v. 47, n. 9, p. 3727-3732, 1999.
- [125] NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 64, n. 4, p. 912-917, 2004.
- [126] ARRUDA, M. A. Z.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Determination of aluminium in slurry and liquid phase of juices by flow injection analysis graphite furnace atomic spectrometry. **Anal. Chem.** v. 65, n. 22, p. 3331-3335, 1993.
- [127] BUTCHER, D. J. Advances in electrothermal atomization for atomic absorption and atomic fluorescence. **Appl. Spectrosc. Rev.** v. 37, n. 3, p. 305-319, 2002.

[128] de BENZO, Z. A.; VELOSA, M.; CECCARELLI, C.; de la GUARDIA, M.; SALVADOR, A. Application of the slurry technique to biological materials - A survey of literature. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 339, n. 4, p. 235-239, 1991.

[129] DARKE, S. A.; TYSON, J. F. Review of solid sample introduction for plasma spectrometry and a comparison of results for laser ablation, electrothermal vaporization and slurry nebulization. **Microchem. J.** v. 50, n. 3, p. 310-336, 1994.

[130] EBDON, L.; FOULKES, M.; SUTTON, K. Slurry nebulization in plasmas. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 12, n. 1, p. 213-229, 1997.

[131] MAGALHÃES, C. E. de C.; ARRUDA, M. A. Z. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 459-466, 1998.

[132] de AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais - Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo, Atheneu, 2003.

[133] BARCELOUX, D. G. Copper. **Clin. Toxicol.** v. 37, n. 2, p. 217-230, 1999.

[134] BERTI, W. R.; JACOBS, L. W. Heavy metals in the environment. Distribution of trace elements in soil from repeated sewage sludge applications. **J. Environ. Qual.** v. 27, n. 6, p. 1280-1286, 1998.

[135] UAUY, R.; OLIVARES, M.; GONZALES, M. Essentiality of copper in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 67S, n. 2, p. 952S-959S, 1998.

[136] BLACKMORE, G. Temporal and spatial biomonitoring of heavy metals in Hong Kong coastal waters using *Tetraclita squamosa*. **Environ. Pollut.** v. 106, n. 2, p. 273-283, 1999.

- [137] BENCKO, V.; CIKRT, M. Manganese: a review of occupational and environmental toxicology. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. and Immunol.** v. 28, n. 2, p. 139-148, 1984.
- [138] LORANGER, S.; TETRAULT, M.; KENNEDY, G.; ZAYED, J. Manganese and other trace elements in urban snow near an expressway. **Environ. Pollut.** v. 92, n. 2, p. 203-211, 1996.
- [139] JARVISALO, J.; OLKINUORA, M.; KIILUNEN, M.; KIVISTO, H.; RISTOLA, P.; TOSSAVAINEN, A.; AITIO, A. Urinary and blood manganese in occupationally non exposed populations and in manual metal arc welders of mild steel. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 63, n. 3, p. 495-501, 1992.
- [140] BARMAN, S. C.; SAHU, R. K.; BHARGAVA, S. K.; CHATERJEE, C. Distribution of heavy metals in wheat, mustard, and weed grown in field irrigated with industrial effluents. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 64, p. 489-496, 2000.
- [141] DELAFUENTE, J. C. Nutrients and immune responses. **Rheum. Dis. Clin. North Am.** v. 17, n. 2, p. 203-212, 1991.
- [142] ZANTOPOULOS, N.; ANTONIOU, V.; NIKOLAIDIS, E. Copper, zinc, cadmium and lead in sheep grazing in North Greece. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 62, p. 691-699, 1999.
- [143] DELAFUENTE, J. C. Nutrients and immune responses. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.** v. 17, n. 2, p. 203-212, 1991.
- [144] WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3rd edition, New York, Wiley-VCH, 1999.
- [145] KOIRTYOHANM, S. R. A history of atomic spectroscopy. **Spectrochim. Acta B**, v. 35, n. 11 , p. 663-670, 1990.

- [146] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª edição, Porto Alegre, Bookman, 2002.
- [147] SNEDDON, J.; FARAH, B. D.; FARAH, K. S. Multielement atomic absorption spectrometry: A historical perspective. **Microchem. J.** v. 48, n. 3 , p. 318-325, 1993.
- [148] HARNLY, J.; MILLER-IHLI, N. J.; O'HAVER, T. C. Simultaneous multielement atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomization. **Spectrochim. Acta B**, v. 39, n. 2, p. 305-320, 1984.
- [149] AMORIM, F. A. C. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.
- [150] LOBO, I. P. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal da Bahia, Salvador 2005.
- [151] PROJAHN, H.; STEEG, U.; SANDERS, J.; VANCLAY, E. Application of reference-element technique for fast sequential flame atomic absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 378, n. 4, p. 1083-1087, 2004.
- [152] KRUG, F. J. **Métodos de decomposição de amostras**. In: IV Workshop sobre Preparo de Amostras, Salvador, 4ª edição, 2003.
- [153] GORSUCH, T. T. **The destruction of organic matter**, Oxford, Pergamon Press, 1970.
- [154] OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends, **J. Braz. Chem. Soc.** v. 14, n. 2 , p. 174-182, 2003.
- [155] THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.** v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- [156] MILLER J. C.; MILLER, J. N. **Estadística para Química Analítica**. 2ª ed. Wilmington, Addison-Wesley Iberoamerican S.A. 1993.

ANEXO A

Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 D.O. de 24/07/1978

A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, em conformidade com o artigo nº 64, do Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969 e de acordo com o que foi estabelecido na 410ª. Sessão Plenária, realizada em 30/03/78, resolve aprovar as seguintes NORMAS TÉCNICAS ESPECIAIS, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. À medida que a CNNPA for fixando os padrões de identidade e qualidade para os alimentos (e bebidas) constantes desta Resolução, estas prevalecerão sobre as NORMAS TÉCNICAS ESPECIAIS ora adotadas.

CHOCOLATE

1. DEFINIÇÃO

Chocolate é o produto preparado com cacau obtido por processo tecnológico adequado e açúcar, podendo conter outras substâncias alimentícias aprovadas.

2. DESIGNAÇÃO

O produto é denominado "chocolate" seguido de sua classificação, podendo ser acrescentado o nome da forma de apresentação comercial. Ex.: "chocolate em pó", "Chocolate em tablete", "chocolate com amendoim".

3. CLASSIFICAÇÃO

O chocolate, de acordo com a sua composição, é classificado em:

- a) chocolate em pó - produto obtido pela mistura de cacau em pó com açúcar;
- b) chocolate em pó parcialmente desengordurado e chocolate em pó solúvel - produto obtido pela mistura de cacau em pó parcialmente desengordurado ou cacau solúvel, com açúcar;
- c) chocolate ao leite produto preparado com pasta de cacau, açúcar e leite, leite em pó evaporado ou condensado;
- d) chocolate fantasia ou composto - produto preparado com mistura, em proporções variáveis, de chocolate, adicionado ou não de leite e de outros ingredientes, tais como amêndoa, avelã, amendoim, nozes, mel e outras substâncias alimentícias, que caracterizam o produto; sua denominação estará condicionada ao ingrediente com que foi preparado.
- e) chocolate "fondant" e chocolate tipo suíço - produto contendo no mínimo 30% de gordura de cacau, o que abaixa o seu ponto de fusão;
- f) chocolate recheado moldado - produto contendo um recheio de substâncias comestíveis, completamente recoberto de chocolate. O recheio deve diferir nitidamente da cobertura, em sua composição. No mínimo 40% do peso total do produto, deve consistir de chocolate. O produto deve ser denominado chocolate com recheio, seguido da denominação recheio. Ex.: "chocolate com recheio de geléia de frutas";
- g) chocolate amargo - produto preparado com cacau, pouco açúcar adicionado ou não de leite;
- h) chocolate cobertura - produto preparado com menor proporção de açúcar e maior proporção de manteiga de cacau, empregado no revestimento de bombons e outros produtos, de confeitaria.

4. CARACTERÍSTICAS GERAIS

O chocolate deve ser obtido de matérias primas sãs e limpas, isentas de matéria terrosa, de parasitos, detritos animais, cascas de sementes de cacau e de outros detritos vegetais. No preparo de qualquer qualidade de chocolate, o cacau correspondente ao tipo deve entrar, no mínimo, na proporção de 32%. O açúcar empregado no seu preparo deve ser normalmente sacarose, podendo ser substituído parcialmente por glicose pura ou lactose. É expressamente proibido adicionar gordura e óleos estranhos à qualquer tipo de chocolate, bem como, a manteiga de cacau. Os chocolates não podem ser adicionados de amidos e féculas estranhas.

5. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS

Aspectos massa ou pó homogêneo (exceto no tipo fantasia).

Cor: própria

Cheiro: característico.

Sabor: doce, próprio.

6. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS

Umidade, máximo 3,0% p/p

Glicídios não redutores, em sacarose, máximo 68,0% p/p

Lipídios: Chocolate, mínimo 20,0% p/p

Chocolate em pó, mínimo 6,5% p/p

Chocolate em pó parcialmente desengordurado 2,5a 6,4% p/p

Resíduo mineral fixo, máximo 2,5% p/p (exceto para o chocolate solúvel)

7. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Os chocolates devem obedecer ao seguinte padrão:

*Contagem padrão em placas:: máximo, 5×10^4 /g.

* Bactérias do grupo coliforme: máximo, 102/g.

Bactérias do grupo coliforme de origem fecal, ausência em 1g.

*Clostrídios sulfito redutores (a 44°C): máximo 2×10 /g.

*Staphylococcus aureus: Ausência em 0,1 g.

Salmonelas: ausência em 25g.

*Bolores e leveduras: máximo, 103/g.

Deverão ser efetuadas determinações de outros microrganismos e/ou de substâncias tóxicas de origem microbiana, sempre que se tornar necessária a obtenção de dados adicionais sobre o estado higiênico-sanitário dessa classe de alimento, ou quando ocorrerem tóxi-infecções alimentares.

8. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Ausência de sujidades, parasitos e larvas.

9. ROTULAGEM

O rótulo deve trazer a denominação genérica de "Chocolate" seguida da classificação constante desta Norma. No chocolate de fantasia ou composto, deve também constar a declaração das substâncias adicionais que caracterizam o produto. Nos chocolates em pó parcialmente desengordurados é obrigatório a declaração do teor de lipídios do produto.

(*) Significa período de carência de 2 anos a partir da data da publicação

ANEXO B

Decreto Nº 55.871, de 26 de março de 1965

Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA , usando das atribuições que lhe confere o artigo 87, inciso I, da Constituição Federal, e na conformidade do que estatui a letra " b " do número XV do artigo 5º da Constituição Federal e nos termos da Lei nº 2.312, de 3 de setembro de 1954, regulamentada pelo Decreto nº 49.974-A, de 21 de julho de 1961,

DECRETA:

Art 1º Considera-se alimento, para os fins do presente Decreto a substância destinada a ser ingerida pelo homem e fornecer elementos necessários a seu desenvolvimento e manutenção.

§ 1º Inclui-se as bebidas entre os alimentos.

§ 2º As expressões "gêneros alimentícios" e "produto alimentícios" são empregados com o mesmo sentido da palavra alimento.

Art 2º Considera-se aditivo para alimento a substância intencionalmente adicionada ao mesmo com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo.

Parágrafo único. Excluem-se do disposto neste artigo, os ingredientes normalmente exigidos para o preparo do alimento.

Art 3º Considera-se "aditivo incidental" a substância residual ou migrada, presente no alimento, como decorrência das fases de produção, beneficiamento, acondicionamento, estocagem e transporte do alimento ou das matérias primas nele empregadas.

Parágrafo único. Os aditivos a que se refere este artigo não devem exercer efeito sobre as propriedades do alimento.

Art 4º Os aditivos a que se refere o presente Decreto compreendem:

- 1) Corante - a substância que confere ou intensifica a cor dos alimentos.
- 2) Flavorizante - a substância que confere ou intensifica o sabor e o aroma dos alimentos e aromatizantes a substância que confere e intensifica o aroma dos alimentos.
- 3) Conservador - a substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microorganismos ou enzimas.
- 4) Antioxidante - a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos.
- 5) Estabilizante - a substância que favorece e mantém as características físicas das emulsões e suspensões.
- 6) Espumífero e Antiespumífero - a substância que modifica a tensão superficial dos alimentos líquidos.
- 7) Espessante - a substância capaz de aumentar, nos alimentos, a viscosidade de soluções, emulsões e suspensões.
- 8) Edulcorante - a substância orgânica artificial, não glicídica, capaz de conferir sabor doce aos alimentos.
- 9) Umectante - a substância capaz de evitar a perda da umidade dos alimentos.
- 10) Antiumectante - a substância capaz de reduzir as características higroscópicas dos alimentos.
- 11) Acidulante - a substância capaz de comunicar ou intensificar o gosto ácido dos alimentos.

Parágrafo único. Para os fins do presente Decreto, a adição de substâncias reveladoras, indicadoras, suplementares, medicamentosas e profiláticas aos alimentos terão seu uso e teor regidos pela legislação específica.

Art 5º Será tolerado o uso do aditivo desde que:

- a) seja indispensável à adequada tecnologia de fabricação;
- b) tenha sido previamente registrado no órgão competente do Ministério da Saúde;
- c) seja empregado na quantidade estritamente necessária à obtenção do efeito desejado, respeitado o limite máximo que vier a ser fixado.

Art 6º Ficam isentos do registro prévio os aditivos incluídos na Farmacopéia Brasileira.

Parágrafo único. É obrigatório constar da rotulagem do aditivo o seu nome, o número de registro ou a declaração: "Segundo a Farmacopéia Brasileira".

Art 7º O emprego de novos aditivos dependerá de aprovação pela Comissão Permanente a que se refere o presente Decreto, devendo a solicitação prévia ser instruída com os seguintes elementos:

- a) finalidade do uso do aditivo;
- b) relação dos alimentos aos quais se deseja incorporá-lo;
- c) natureza química e suas propriedades;
- d) documentação científica, com os resultados das provas efetuadas, de ser o mesmo inócuo na quantidade que se propõe usar;
- e) detalhes sobre as medidas a serem tomadas pelo fabricante para o controle do aditivo no alimento, inclusive métodos de análises qualitativa e quantitativa;
- f) nome do tecnólogo responsável.

Art 8º É proibido o uso de aditivo em alimentos quando:

- 1) houver evidência ou suspeita de que o mesmo possui toxicidade atual ou potencial;
- 2) interferir sensível e desfavoravelmente no valor nutritivo do alimento;
- 3) servir para encobrir falhas no processamento e nas técnicas de manipulação;
- 4) encobrir alteração ou adulteração na matéria prima ou do produto já elaborado;
- 5) induzir o consumidor a erro, engano ou confusão;
- 6) não satisfazer as exigências do presente decreto.

Art 9º Os alimentos que contiverem aditivos deverão trazer, na rotulagem, a indicação dos aditivos utilizados, explicitamente ou em código, a juízo da autoridade competente, devendo, porém, em ambos os casos, ser mencionada, por extenso, a respectiva classe.

Art 10. Os corantes tolerados pelo presente Decreto compreendem: corantes naturais, caramelo e corantes artificiais.

§ 1º Considera-se "corante natural" o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal.

§ 2º Considera-se "caramelo" o produto obtido, a partir de açúcares, pelo aquecimento e temperatura superior ao seu ponto de fusão e ulterior tratamento indicado pela tecnologia.

§ 3º Considera-se "corante artificial" a substância, corante artificial de composição química definida, obtida por processo de síntese.

Art 11. Nos alimentos contendo corante artificial é obrigatória a declaração "Colorido Artificialmente".

Art 12. Será obrigatório constar da rotulagem do corante: o número do registro; o nome comercial do sinônimo oficialmente reconhecido conforme discriminação deste Decreto e ainda a declaração de que se destina a gêneros alimentícios.

Art 13. Será tolerada a venda de mistura ou solução de, no máximo, três corantes.

Parágrafo único. Deverá constar da rotulagem da mistura ou da solução posta à venda sua composição qualitativa e quantitativa, bem como o número de registro dos corantes componentes.

Art 14. Será tolerado nos alimentos emprego de mistura de antioxidantes na dose máxima de 0,02g (dois centigramas) por cento no total, ressalvados os casos previstos na Tabela I, anexa.

Art 15. Os flavorizantes e os aromatizantes tolerados no presente Decreto compreendem: essências naturais, essências artificiais, extratos vegetais aromáticos e flavorizantes quimicamente definidos.

Art 16. Considera-se "essência natural", "óleo essencial", "óleo etéreo" ou simplesmente "essência", o produto aromático, sávido, volátil, sob a forma oleosa, extraído de vegetais.

§ 1º As essências naturais, puras ou em mistura, podem ser apresentadas "in natura" ou adicionadas de outras substâncias próprias para uso alimentar, devendo constar da rotulagem a natureza do veículo e a concentração da essência.

§ 2º As essências naturais podem ser privadas de algum de seus componentes, desde que satisfaçam às exigências relativas às essências no que lhes seja aplicável, devendo constar da rotulagem as modificações sofridas.

Art 17. Considera-se "essência artificial" o produto constituído por substâncias artificiais aromáticas, contendo ou não substâncias extraídas de vegetais.

Parágrafo único. As essências artificiais podem ser apresentadas em solução ou adicionadas de outras substâncias próprias para uso alimentar, devendo constar da rotulagem a natureza do diluente e o teor da essência.

Art 18. Considera-se "extrato vegetal aromático" o produto aromático e sávido obtido de plantas ou de partes de plantas.

Art 19. Considera-se "flavorizante quimicamente definido" o princípio ativo aromático e sávido, natural ou sintético, quimicamente definido.

Art 20. É proibida, aos flavorizantes, a adição:

- a) de corantes, exceto o caramelo;
- b) de substâncias de efeitos fisiológicos indeterminados;
- c) das seguintes substâncias:

Ácidos minerais; ácidos cianídrico e seus derivados; ácido salicílico, seus sais e seus ésteres; ácidos benzóico seus sais e seus ésteres; ésteres de ácido nítrico; brometo, cloreto e iodeto de etíla; cloroformio; éter etílico; álcool metílico; nitro benzeno; etileno glicol; di-etileno glicol; di-etileno glicol etil-éter; cumarina e outras substâncias prejudiciais à saúde.

Art 21. Nos alimentos contendo essência artificial ou flavorizante sintético será obrigatório a declaração: "Aromatizado artificialmente".

Art 22. Ficam sujeitos ao presente Decreto os produtos alimentícios importados.

Art 23. Os produtos alimentícios destinados a exportação poderão ser especialmente fabricados de acordo com as normas sobre aditivos do país a que se destinem, devendo, nestas circunstâncias, constar da rotulagem a declaração: "Produto destinado a exportação, não podendo ser vendido no território nacional."

Art 24. Constitui infração passível de sanções prevista na legislação em vigor fabricar, manter em depósito, expor à venda ou dar ao consumo produtos em desacordo com o presente Decreto.

Art 25. Fica instituída uma Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos (C.P.A.A.), vinculada ao Ministério da Saúde e integrada por um (1) representante da Comissão Nacional de Alimentação, um (1) representante do Serviço de Inspeção de Produtos Agropecuários e Materiais Agrícolas, um (1) representante do Instituto de Fermentação, um (1) representante do Instituto Adolfo Lutz, um (1) representante do Instituto Dr. Francisco Albuquerque, um (1) representante do Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos, um (1) representante do Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e Farmácia e um (1) técnico em Bromatologia indicado pela Confederação Nacional da Indústria, sob a presidência do Diretor-Geral do Departamento Nacional de Saúde.

Art 26. Competirá à C.P.A.A. a que se refere o artigo anterior:

- a) dispor sobre a forma do seu funcionamento;
- b) elaborar e rever a lista dos aditivos cuja adição direta ao alimento seja permitida, fixando os respectivos limites de tolerância e estabelecendo seus padrões de identidade e qualidade;
- c) elaborar e rever a lista dos "aditivos incidentais" fixado o respectivo limite de tolerância e estabelecendo, quando necessário, padrões de identidade e qualidade;

d) encaminhar suas resoluções e deliberações diretamente para publicação nos órgãos oficiais.

§ 1º As listas a que se refere este artigo poderão ser revista por iniciativa da C.P.A.A. ou a requerimento da parte interessada.

§ 2º A proposta de modificação, a que se refere o parágrafo anterior, será formulada na conformidade das normas aprovadas pela C.P.A.A.

§ 3º As resoluções da C.P.A.A. serão publicadas nos órgãos oficiais, podendo delas ser dado conhecimento aos interessados mediante circulares.

§ 4º As deliberações da C.P.A.A. produzirão efeito na data da sua publicação em órgão oficial, excetuados os casos em que a própria C.P.A.A. fixar prazo especial.

§ 5º Caberá recurso de decisão da C.P.A.A. a ela endereçado e sobre o qual a mesma disporá na forma estabelecida em conformidade com a alínea " a " deste artigo.

Art 27. A C.P.A.A. reunir-se-á no período de fevereiro a novembro de cada ano, ordinariamente duas vezes por mês, e extraordinariamente desde que convocada por seu presidente, por iniciativa própria ou a requerimento de mais de um terço de seus membros.

Art 28. Caberá aos diretores das repartições indicadas no artigo 25 designar os respectivos representantes e seus suplentes.

Art 29. Os membros da C.P.A.A. farão jus a gratificação de categoria A, até o máximo de 4 (quatro) reuniões mensais, na forma do Decreto nº 55.090, de 28 de novembro de 1964, correndo as despesas por conta da dotação que couber, do Ministério da Saúde.

Art 30. Ficam mantidos os aditivos constantes das tabelas anexas aos Decretos nº s 50.040-61 e 691-62 com as alterações introduzidas nas Tabelas, que acompanham o presente Decreto, pela Comissão Permanente, instituída pelo art. 25 do Decreto número 50.040-61.

§ 1º A C.P.A.A. poderá excluir qualquer dos aditivos anteriormente permitidos, incluir novos aditivos ou alterar os limites de adição anteriormente fixados, desde que nova concepção científica ou técnica contrarie convicção estabelecida quanto à sua inocuidade ou limites de tolerância.

§ 2º As alterações a que se refere o parágrafo anterior deverão ser devidamente fundamentadas e o teor dessa fundamentação será levado ao conhecimento dos interessados.

Art 31. A aplicação do presente Decreto incumbe em cada caso às autoridades sanitárias federais, estaduais ou municipais, que aplicarão as sanções decorrentes do seu não cumprimento, nos termos da legislação ordinária vigente.

Art 32. Este Decreto entrará em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Brasília, 26 de março de 1965; 144º da Independência e 77º da República.

H. Castello Branco

Raymundo de Britto

ANEXO

Contaminantes Inorgânicos

Contaminante Inorgânicos	Alimentos em que podem ser encontrados	Limite Máximo de Tolerância LMT (ppm)
Antimônio	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,20
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	0,20
	Refrescos e refrigerantes	0,20
	Sucos de frutas e xaropes naturais	1,00
	Outros alimentos	2,00
Arsênico	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,20
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	0,10
	Refrescos e refrigerantes	0,20
	Sucos de frutas e xaropes naturais	0,50
	Outros alimentos	1,00

Cádmio	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,50	
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	0,20	
	Refrescos e refrigerantes	0,20	
	Sucos de frutas e xaropes naturais	0,50	
	Outros alimentos	1,00	
Cobre	Bebidas alcoólicas fermentadas	5,00	
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	10,00	
	Refrescos e refrigerantes	5,00	
	Sucos de frutas e xaropes naturais	30,00	
	Outros alimentos	30,00	
Cromo	Qualquer alimento	0,10	
Estanho	Qualquer alimento	250,00	
Mercúrio	Peixes, crustáceos e moluscos	0,50	
	Qualquer outro alimento	0,01	
Níquel	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,10	
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	3,00	
	Refrescos e refrigerantes	0,10	
	Sucos de frutas e xaropes naturais	3,00	
	Produtos hidrogenados	4,00	
	Outros alimentos	5,00	
Selênio	Alimentos sólidos	0,30	
	Alimentos líquidos	0,05	
Zinco	Bebidas alcoólicas fermentadas	5,00	
	Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	5,00	
	Refrescos e refrigerantes	5,00	
	Sucos de frutas e xaropes naturais	25,00	
	Outros alimentos	50,00	
	Origem animal	"in natura"	Industrializado
	Carnes	0,50	1,00
	Aves	0,20	1,00

Chumbo	Pescado	2,00	2,00
	Leite	0,05	0,05
	Derivados do leite:	.	.
	queijo	-	1,00
	manteiga	-	0,10
	outros	-	0,20
	Ovos	0,10	0,20
	Origem vegetal	.	.
	Bulbos	0,50	0,50
	Raízes e tubérculos	0,50	0,50
	Cereais	0,50	0,50
	Hortaliças	0,50	0,50
	Leguminosas	0,50	0,50
	Frutas (exceto sucos, néctares, cristalizadas ou glaceadas)	0,50	0,50
	Sucos e néctares de frutas	-	0,40
	Frutas cristalizadas ou glaceadas	-	1,00
	Oleaginosas	0,20	0,20
	Específico		
	Óleos e gorduras	-	0,10
	Margarina	-	0,10
	Refrescos e refrigerantes	-	0,20
	Bebidas alcoólicas	-	0,50
	Cacau (exceto manteiga de cacau e chocolate adoçado)	-	2,00
	Manteiga de cacau	-	0,50
	Chocolate adoçado	-	1,00
	Chocolate não adoçado	-	2,00
	Açúcar (sacarose)	-	2,00
	Dextrose (glicose)	-	2,00
	Frutose	-	0,50
	Xarope de glicose	-	2,00
	Lactose	-	2,00
	Café torrado e moído	-	1,00
	Alimento infantil	-	0,20
Caseína e caseinatos	-	2,00	
Outros	0,80	0,80	
Chumbo			

ANEXO C

Portaria N ° 685, de 27 de agosto de 1998

O Secretário de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, no uso de suas atribuições legais e considerando: a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando a proteção à saúde da população; que é indispensável o estabelecimento de regulamentos técnicos sobre contaminantes em alimentos, com vistas a minimizar os riscos à saúde humana;

o previsto na Resolução GMC 126/94, que determina que a legislação nacional se mantém vigente em cada país até que sejam harmonizados instrumentos quadripartites específicos e estes sejam devidamente incorporados ao ordenamento jurídico nacional;

os pontos já harmonizados no MERCOSUL sobre o tema (Resoluções GMC 102/94, 103/94 e 35/96), resolve:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos".

Parágrafo único - Nos casos dos alimentos não contempladas no presente Regulamento, permanecem vigentes os limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos já previstos na legislação nacional.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação revogando-se as disposições em contrário.

GONZALO VECINA NETO

REGULAMENTO TÉCNICO
PRINCÍPIOS GERAIS PARA O ESTABELECIMENTO DE NÍVEIS MÁXIMOS DE CONTAMINANTES
QUÍMICOS EM ALIMENTOS

1 Serão estabelecidos níveis máximos de contaminantes (micotoxinas, contaminantes inorgânicos, resíduos de pesticidas, medicamentos de uso veterinário e de migrantes de embalagens e equipamentos em contato com alimentos) em alimentos que constituam riscos à saúde humana tendo por base as seguintes informações:

1.1 Regulamentos técnicos que definam níveis máximos de contaminantes em alimentos no âmbito regional e/ou internacional.

1.2 Dados representativos da região sobre: incidência do contaminante, antecedentes do problema detectado, dados analíticos e indicações sobre os possíveis problemas para a saúde.

1.3 Relação dos alimentos de maior importância comercial entre os Estados-Partes.

1.4 Dados e informações toxicológicas.

1.5 Normas, diretrizes ou recomendações da Comissão do Codex Alimentarius, União Européia, FDA ou outros organismos reconhecidos internacionalmente.

1.6 Dados existentes na literatura científica.

1.7 Boas práticas agrícolas, pecuárias, industriais e analíticas.

1.8 Possibilidades tecnológicas da região.

2.0 estabelecimento dos níveis máximos de contaminantes será realizado levando-se em conta, além do estabelecido no ponto 1, o seguinte:

2.1 Estabelecer níveis máximos de contaminantes em alimentos industrializados específicos, quando se justifique em termos de proteção à saúde humana. Nestes casos, devem ser estabelecidos previamente níveis de contaminação nos produtos primários.

2.2 Os níveis máximos de contaminantes em alimentos serão considerados na avaliação de impacto à saúde do consumidor.

2.3 Os níveis máximos serão fundamentados em princípios científicos.

2.4 Quando necessário, os níveis máximos de contaminantes devem ser acompanhados dos sistemas de amostragem e metodologia analítica, assim como dos critérios de aceitação e rejeição.

3. Serão utilizados como guia para o sistema de classificação e numeração de contaminantes as referências do CODEX ALIMENTARIUS.

4. Os critérios de inclusão, exclusão ou modificação são estabelecidos nos pontos 1 e 2 deste Regulamento.

ANEXO

LIMITES MÁXIMOS DE TOLERÂNCIA PARA CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS

1. ALCANCE

Este Regulamento Técnico estabelece os limites máximos de tolerância dos contaminantes inorgânicos: arsênio, cobre, estanho, chumbo, cádmio e mercúrio, nas classes de alimentos relacionadas abaixo.

2. LIMITES MÁXIMOS

ARSÊNIO

Gorduras vegetais	0,1 mg/kg
Gorduras e emulsões refinadas	0,1 mg/kg
Gorduras hidrogenadas	0,1 mg/kg
Açúcares	1,0 mg/kg
Caramelos e balas	1,0 mg/kg
Bebidas alcoólicas fermentadas	0,1 mg/kg
Bebidas alcoólicas fermento-destiladas	0,1 mg/kg
Cereais e produtos a base de cereais	1,0 mg/kg
Gelados comestíveis	1,0 mg/kg
Ovos e produtos de ovos	1,0 mg/kg
Leite fluído, pronto para o consumo	0,1 mg/kg
Mel	1,0 mg/kg
Peixe e produtos de peixe	1,0 mg/kg
Produtos de cacau e derivados	1,0 mg/kg
Chá, mate, café e derivados	1,0 mg/kg

COBRE

Óleos e gorduras virgens	0,4 mg/kg
--------------------------	-----------

Óleos, gorduras e emulsões refinadas	0,1 mg/kg
Caramelos e balas	10 mg/kg
Bebidas alcoólicas fermentadas	10 mg/kg
Frutas, hortaliças e sementes oleaginosas in natura e industrializadas	10 mg/kg
Gelados comestíveis	10 mg/kg
Lactose	2,0 mg/kg
Mel	10 mg/kg
ESTANHO	
Sucos de frutas cítricas (enlatados)	150 mg/kg
CHUMBO	
Óleos, gorduras e emulsões refinadas	0,1 mg/kg
Caramelos e balas	2,0 mg/kg
Cacau (exceto manteiga de cacau e chocolate adoçado)	2,0 mg/kg
Chocolate adoçado	1,0 mg/kg
Dextrose (glucose)	2,0 mg/kg
Sucos de frutas cítricas	0,3 mg/kg
Leite fluído, pronto para consumo	0,05 mg/kg
Peixes e produtos de pesca	2,0 mg/kg
Alimentos para fins especiais, preparados especialmente para lactentes e crianças até três anos)	0,2 mg/kg
Partes comestíveis cefalópodes	2,0 mg/kg
CÁDMIO	
Peixes e produtos da pesca	1,0 mg/kg
MERCÚRIO	
Peixes e produtos da pesca (exceto predadores	0,5 mg/kg
Peixes predadores	1,0 mg/kg

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - SEPN 515, Bl.B, Ed.Ômega - Brasília (DF) CEP 70770-502 - Tel:

(61) 3448-1000

Disque Saúde: 0 800 61 1997